

Serologische Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen
zwischen Bakteriozinen und Bakteriophagen bei
Proteus rettgeri

Hildegard Baumgarten

1902

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
der Universität München
Direktor Prof. Dr. F. Deinhardt

Serologische Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen
zwischen Bakteriozinen und Bakteriophagen bei
Proteus rettgeri

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der ge-
samten Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Hildegard Baumgarten

aus
München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1982



Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind danke ich für die Überlassung des Themas und für seine Betreuung und Hilfe während der Entstehung dieser Arbeit.

Den Direktoren des Max von Pettenkofer-Instituts, Herrn Prof. Dr. Dr. H. Eyer und Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt möchte ich besonders danken für die großzügige Bereitstellung von Einrichtungen und Arbeitsmaterial des Instituts.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch den Damen im Labor, insbesondere Frau Chr. Petermüller und Fräulein J. Burrows, für ihre stete geduldige Hilfsbereitschaft und Anleitung.

Anlässlich des 60. Geburtstages
meines Vaters meinen Eltern in
Dankbarkeit gewidmet.

Zusammenfassung

1. In 54 von 105 *Proteus rettgeri* - Isolaten wurden Bakteriozine bzw. bakteriozinähnliche Substanzen im Flüssigkulturüberstand nachgewiesen.
2. Die Bedingungen zur Synthese von Rettgerocinsuspensionen wurden optimiert.
3. Drei Rettgerocine wurden zum Immunisieren von Kaninchen und zur Gewinnung neutralisierender Antikörper gereinigt.
4. 19 Rettgerocine und neun Bakteriophagen wurden mit drei Anti-Rettgerocin-Sera per Neutralisationstest klassifiziert, die Producer- und Indikatorstämme mit sechs Antisera gegen O-Antigene serotypiert.
 - 4.1. 15 Rettgerocine und drei Bakteriophagen ließen sich mit Antisera neutralisieren. Neun verschiedene Serotypen konnten voneinander abgegrenzt werden.
Dabei ergab sich
 - 4.1.1. Producer, die dasselbe Rettgerocin bilden, waren im Serotyp verwandt.
 - 4.1.2. Indikatorstämme für dieselben Rettgerocine waren im Serotyp verschieden, d.h. Rettgerocinrezeptoren nicht identisch mit dem O-Antigen.
 - 4.1.3. Rettgerocine und Bakteriophagen sind durch dasselbe Antiserum neutralisierbar und demnach eng verwandt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	3
1. Material	3
1.1. Stämme	3
1.2. Medien, Reagenzien	4
1.3. Geräte	6
2. Methoden	6
2.1. Bakteriozinnachweis im festen Medium	6
2.2. Bakterionzinsuspensionen	9
2.3. Bakteriozinnachweis im flüssigen Medium	9
2.4. Phagenausschluß	11
2.4.1. Herstellung eines Phagenlysats	11
2.4.2. Modifizierter Phagennachweis im festen Medium	12
2.5. Bakteriozinaanreicherung durch Sedimentieren	12
2.6. Antikörper gegen Rettgerocine	13
2.6.1. Antigenpräparation	13
2.6.2. Immunisierungstechnik und Serumgewinnung	14
2.6.3. Präabsorption der Antisera und der Rettgerocinsuspensionen	15
2.6.4. Antikörpernachweis durch Immundiffusion	15
2.6.5. Antikörpernachweis im Neutralisationstest	16
2.7. Serotypisierung der Stämme	16
2.7.1. Antigenpräparation	16
2.7.2. Immunisierungstechnik	17
2.7.3. Röhrchenagglutinationstest mit O-Antigen	17
2.7.4. Objektträgeragglutination mit Lebendantigen	17
III. Ergebnisse	18
1. Producer im flüssigen Medium und ihr Indikatorspektrum	18
2. Charakterisierung der Rettgerocine	23
2.1. Zusammenhang zwischen Rettgerocinbildung und Kulturbedingungen	23
2.1.1. Der maximal erreichte Titer	23
2.1.2. Abhängigkeit des Titers von der Mitomycinkonzentration	27
2.1.3. Abhängigkeit des Titers von der Bakteriendichte	28
2.1.4. Abhängigkeit des Titers vom Indikatorstamm	31

	Seite
2.2. Phagenausschluß	35
2.2.1. Phagenlysate	35
2.2.2. Phagenausschluß durch modifizierten Hemmstoffnachweis im festen Medium	37
2.2.3. Phagen; Zusammenfassung	42
2.3. Antigenität der Rettgerocine	42
2.3.1. Antikörpernachweis durch Immun- diffusion	42
2.3.2. Antikörpernachweis im Neutralisa- tionstest	45
2.4. Zusammenfassung: Charakterisierung der Hemmstoffe	49
3. Serotypisierung der Pt. rettgeri-Stämme	51
3.1. Serotypisierung nach Gruber Widal	51
3.2. Typisierung mit Objektträgeragglutination	56
4. Vergleich zwischen Serotyp der Producer- und Rettgerocintyp	56
5. Indikatoreigenschaften bei Proteus rettgeri	58
5.1. Empfindlichkeitsspektren	58
5.2. Indikatoren mit (teil)identischer Empfind- lichkeit und ihr Serotyp	59
5.3. Zuverlässigkeit der Indikatoren	63
5.4. Abhängigkeit der Empfindlichkeit vom Rettgerocintiter	64
IV. Diskussion	65
1. Herstellung von Rettgerocinpräparationen	65
2. Serotypisierung der Rettgerocine	66
3. Serotypisierung der Bakteriophagen	67
4. Serotypisierung der Stämme	68
Schrifttum	70

Tabellenverzeichnis

Nr.		Seite
1	Hemmstoffbildende Stämme und ihr Indikator- spektrum im festen und flüssigen Medium	18
2	Hemmspektren im festen Medium	20
3	Hemmspektren im flüssigen Medium	21
4	Schema zur Rettgerocintypisierung	22
5	Zusammenhang zwischen Hemmstofftiter und den Kulturbedingungen	23
6	Spontan Hemmstoff bildende Stämme im flüssigen Medium	27
7	Der maximal erreichte Titer in Abhängigkeit von der Bakteriendichte	28
8	Gleicher Titer bei verschiedenen Kulturvolumina durch Verlängerung der Schüttelzeit	29
9	Hemmspektren der unverdünnten Überstände nach relativer Indikatorempfindlichkeit	32
10	Lysestärke der unverdünnten Rettgerocinsuspensionen	34
11	Phagennachweis in Lysaten	36
12	Phagen im modifizierten Hemmstoffnachweis auf festem Medium	41
13	Phagentypen nach Wirt und Plaquesmorphologie	42
14	O-Antigen in Kulturüberständen	44
15	Rettgerocintypen im Neutralisationstest	47
16	Rettgerocinserotypen	48
17	Phagentypen	49
18	Rettgerocintypen	50
19	Antikörpertiter und kreuzreagierende AK der Typisierungssera	51
20	Ergebnisse der O-Serotypisierung nach Gruber Widal	52
21	O-Serotypen der Producer- und Indikatorstämme	54
22	O-Serotyp nach quantitativen Gesichtspunkten	54
23	Rettgerocine und der Serotyp ihrer Producer	56
24	Schema zur Typisierung nach Rettgerocinempfindlich- keit	59
25	Empfindlichkeitsspektren und Serotyp der Indikator- stämme	61

I. Einleitung

Bis vor wenigen Jahren waren Bakteriozine bei *Proteus rettgeri* (jetzt *Providencia rettgeri*) unbekannt.⁷⁾ Sie wurden 1971 erstmalig beschrieben^{8, 13)} und in jüngster Zeit ihr Vorkommen bei einer größeren Anzahl von Stämmen systematisch untersucht.^{8, 13)} Dabei gelang es, die Stämme zu differenzieren und ein Typisierungsschema mit acht Indikatoren aufzustellen.⁴⁾ Damit wurde neben dem Lyso-typ¹⁰⁾ ein weiterer epidemiologischer Marker für diese Spezies zugänglich gemacht.

Typisierung klinischer Isolate nach Unterschieden in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Stoffwechselprodukten von Stämmen derselben Spezies stellt ein kompliziertes System dar. Das macht verständlich, daß Angaben über die Konstanz von Bakteriozintypen weit voneinander abweichen. Änderungen des Bakteriozintyps eines Stammes kann Folge gewandelter Indikator- oder Produzereigenschaften sein. Sie kann aber auch aufgrund mangelnder Standardisierung der Testbedingungen vorgetäuscht werden.

Nach unseren Erfahrungen ist gerade bei diesen biologischen Nachweisverfahren für einen Zellmarker die Reproduzierbarkeit der Resultate entscheidend determiniert von der Sorgfalt bei der Standardisierung der Tests. Um dafür eine rationale Basis zu schaffen, müssen die miteinander reagierenden Partner in ihren Eigenschaften möglichst exakt charakterisiert sein.

Nachdem Rettgerocine nach Morphologie, Molekulargröße und Proteasestabilität bereits an anderer Stelle analysiert wurden⁵⁾, versuchten wir hier, sie auf immunologischem Wege zu charakterisieren entsprechend der Verwandtschaft ihrer Proteine und Beziehungen zum Lipo-

polysaccharid der Bakterienzellen. Zusammen mit der noch abzuschließenden Aufklärung der Aminosäurezusammensetzung der Rettgerocine sowie der genetischen Grundlagen der Bakteriozinogenie soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur umfassenden Beschreibung dieser antibakteriellen Substanzen bei *Proteus rettgeri* erbringen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Stämme

a) *Proteus rettgeri* Denver (Dr. Ianinni, Veterans Administration Hospital, Denver, Colorado)

44 Stämme:

D1	D10	D19	D27	D37
D2a	D11a	D20	D28	D38
D2b	D11b	D21	D29	D39
D3	D12	D22	D30	D40a
D4	D14	D23	D31	D40b
D6	D15a	D24	D32	D41
D7	D15b	D25	D33	D42
D8a	D16	D26a	D34	D43
D8b	D18	D26b	D35	

b) *Proteus rettgeri* Essen (Dr. Linzenmeier, Institut für Medizin. Mikrobiologie, Robert Koch Haus, Klinikum Essen)

Vier Stämme:

E7	E12	E17	E18
----	-----	-----	-----

c) *Proteus rettgeri* Hongkong (Dr. Huang, Queen Elizabeth Hospital, Hongkong)

Zehn Stämme:

H9	H17	H24	H27b	H32
H11	H21	H27a	H28	H33

d) *Proteus rettgeri* Japan (Serotypen von Dr. Shigeo Namioka¹⁵⁾)

12 Stämme:	Serotyp
Stamm	0 - H
J3	5 : 3
J5	7 : 5
J9	11 : 16
J10	12 : 1
J38	23 : 1
J42	24 : 12
J50	26 : 22
J52	26 : 1
J55	17 : C1 : -
J56	27 : 8
J67	29 : 4
J87	22 : 1

e) *Proteus rettgeri* München (ein im Münchner Klinikbereich isolierter, neuer Biotyp von *Proteus rettgeri*^{1, 2)})

Vier Stämme:

M11	M116	M119	M200
-----	------	------	------

1.2. Medien, Reagenzien

1.2.1. Mueller-Hinton Broth (MHB) pH 7,4
Difco-Laboratories, Detroit

1.2.2. Tryptone-Soya Broth (TSB) pH 7,3
Oxoid Ltd., London

1.2.3. Pepton-Bouillon

Max von Pettenkofer-Institut, München
Auf 1000 ml aqua dest.

Pepton e carne trypt. "Merck"	25 g
NaCl	3 g

K_2HPO_4 2 g

pH 7,4

bei Verwendung als Agar

Bacto-Agar (Difco-Lab.) 20 g

1.2.4. Softagar (0,7 %)

7 g Bacto-Agar (Difco-Lab., Detroit) auf 1000 ml
aqua deion.

1.2.5. Chloroform pro analysi (Merck, Darmstadt)

1.2.6. Mitomycin C (for injection Kyowa, Hakko Kogyo Co.,
Ltd., Tokio)

gelöst in Methanol pro analysi (Merck, Darmstadt)

1.2.7. Freund'sches Adjuvans

Zusammensetzung von 1 ml kompl. Freund'sches Adjuvans:

Bayol F pharm. (für Adj., Paraffinöl),

Serva Heidelberg 0,85 ml

Arlacel A reinst (für Adj., Sorbitan-
dilaurat), Serva Heidelberg

0,15 ml

TBC-Bakterien H37RA, autoklaviert, lyo-
philisiert

0,5 mg

1.2.8. Gepufferte Kochsalzlösung (Max von Pettkofer-
Institut, München)

Stammlösung, zum Gebrauch 1 : 20 verdünnen.

Zusammensetzung auf 1000 ml aqua deion.

NaCl 157,7 g

$K_2HPO_4 \times 3H_2O$ 68,5 g

KH_2PO_4 7,8 g

pH 7,4

1.2.9. Phosphatpuffer

Zusammensetzung auf 1000 ml aqua deion.

KH_2PO_4 4,54 g

$NaHPO_4 \times 2H_2O$ 5,94 g

pH 6,8

1.3. Geräte

1.3.1. Zentrifugen

Zentrifuge	Rotortyp	relative Beschleunigung (g)	Drehzahl (rpm)
Sorvall	SS34	12062	10000
		7719	8000
		3015	5000
		1085	3000
	GS 3	8288	7000
Spinco L50	SW50.1	84000	30000
Beckman	Ti50	133573	45000
Kontron	Ti60	175000	50000
TGA65			

1.3.2. Photometer

Beckman Model C Colorimeter, Filter 660 nm; Messung der Extinktion von Bakterienkulturen (opt. Dichte)

2. Methoden

2.1. Bakteriozinnachweis im festen Medium

Hierbei wird untersucht, ob ein Bakterienstamm (im folgenden als "Producer" bezeichnet) an ein festes Nährmedium Substanzen abgibt, die das Wachstum anderer Bakterienstämme (im folgenden "Indikatoren" genannt) hemmen.

Auf eine zentrale Kreisfläche (5,0 cm Durchmesser) von MH-Agar werden 20 µl einer logarithmischen Flüssigkultur des Producers von oD 0,375 in TSB mit ge-
eichten Platinösen (10 µl) gleichmäßig aufgebracht.

Das ergibt eine Aussaatdichte von $3,8 \times 10^3$ Keimen pro mm^2 .

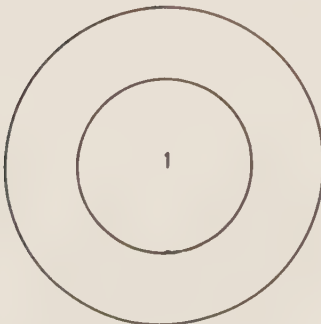
Anschließend werden die Platten 16 h bei 32°C bebrütet. Der Producerrasen wird mechanisch mit Objektträgern und Filtrierpapier entfernt, die Nährbodenoberfläche durch 15-minütiges Einwirken von Chloroformdampf sterilisiert. Man hat so einen Nährboden erhalten, der in seinem zentralen Anteil alle Stoffe enthält, die der Producerstamm bei seinem Wachstum nach außen abgegeben hat.

Auf diesen Nährboden werden nun Indikatoren aufgebracht. Dazu werden Vorkulturen in TSB von o.D. $0,0275$ (etwa $2,75 \times 10^6$ Koloniebildner, K.B., pro ml) benutzt. Man streicht mit der Schmalseite eines rechteckigen Platindrahtspatels je einen Tropfen als feinen Impfstrich vom Plattenrand bis auf 10 mm an den Plattenmittelpunkt heran aus. Die Impfstriche werden im Winkel von 45° zueinander aufgebracht, so daß acht auf einer Platte Platz finden.

Nach Bebrütung über Nacht bei 37°C stellt sich folgendes Ergebnis ein (Abb. 1):

Abb. 1: Bakteriozinnachweis im festen Medium

a



b

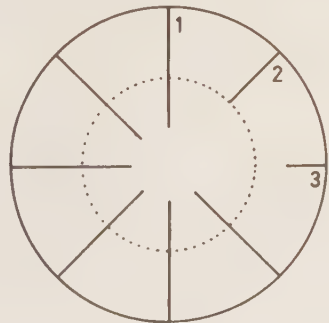


Abb 1 (Fortsetzung)

- a) 1: Fläche des Producerwachstums
- b) 1: Ungehemmtes Indikatorwachstum
- 2: Hemmung des Indikatorwachstums in der zentralen Zone
- 3: Hemmung des Indikatorwachstums durch ein diffundierendes Bakteriozin

Ist in dem Nährboden eine Hemmsubstanz vorhanden, so wächst der betreffende Indikator außerhalb der zentralen Zone normal, innerhalb aber deutlich abgeschwächt oder gar nicht. Diffundiert die Hemmsubstanz, so geht der Bereich gehemmten Indikatorwachstums über die zentrale Zone ("Producerkreis") hinaus.

Blieb der Nährboden hemmsubstanzfrei, so ist das Indikatorwachstum in der zentralen Zone gleich stark wie außerhalb oder nur geringfügig abgeschwächt (bedingt durch das vorausgegangene Producerwachstum).

Unspezifische Hemmeffekte können ausgeschlossen werden, solange nicht alle acht Indikatoren einer Platte gehemmt werden. Das war bei den hier durchgeführten Versuchen nie der Fall.

Bakteriozincharakter kann für eine Hemmsubstanz dann angenommen werden, wenn eine Phagennatur ausgeschlossen worden ist (s. II 2.4. und III 2.2.).

Um die Induzierbarkeit der Hemmstoffbildung durch Mitomycin C zu erfassen, wurde der oben beschriebene Versuch jeweils zusätzlich auf MHA-Nährböden mit 0,1 und 0,25 µg/ml Mitomycin durchgeführt. Zur Abgrenzung einer Hemmung durch Mitomycin C von einer durch Bakteriozine verursachten Indikatorhemmung wurden die Indikatoren zusätzlich auf Kontrollplatten ohne vorangegangenes

Producerwachstum auf ihre Mitomycinempfindlichkeit untersucht.

2.2. Bakteriozinsuspension

Um die Bakteriozine näher untersuchen zu können, mußten Kulturüberstände in möglichst großer Menge und hoher Bakteriozinkonzentration hergestellt werden.

Dazu dienten Flüssigkulturen, die unter den im unten beschriebenen Versuch (II. 2.3.) für den jeweiligen Producer als optimal ermittelten Bedingungen bebrütet wurden.

Für alle Producer wurde TSB als Medium gewählt und bei 32°C, 150 rpm in den ersten acht Stunden bebrütet. Die Einsaat betrug 5×10^7 KB/ml (entspricht oD 0,05). Das Volumen der Kulturen belief sich auf 20 ml in Seitarmkolben à 250 ml bei geringeren Mengen und auf 200 ml in 1000 ml-Kolben mit Dellen für große Mengen (Antigenpräparation, s. II 2.6.1.). Für den jeweiligen Producer wurden die optimale Gesamtbebrütungszeit (zwischen 8 und 24 Stunden) und die optimale Mitomycinkonzentration (zwischen 0,1 und 0,5 µg/ml) für Bakteriozinsynthese ermittelt. Im Anschluß an die Bebrütung wurden die Bakterien bei 10000 rpm, 30 min (Sorvall, Rotor SS34) abzentrifugiert und der Überstand mit einem Zehntel seines Volumens Chloroform zur Bakterieninaktivierung geschüttelt.

2.3. Bakteriozinnachweis im flüssigen Medium

Bei allen Stämmen, die Hemmsubstanzen in ein festes Medium abgegeben hatten, wurde untersucht, ob diese Substanzen auch in Flüssigkultur synthetisiert werden. Hierzu wurden die Producerstämme aus einer Vorkultur (TSB, 37°C) in Seitarmkolben mit 7,0 ml TSB auf eine

oD von 0,05 eingepflegt. Anschließend wurde bei 32°C bebrütet, davon die ersten acht Stunden unter Schütteln (150 rpm). Nach fünf, acht und 24 Stunden wurde die o.D. gemessen und Proben von 1,0 ml entnommen. Aus diesen Proben wurden die Bakterien abzentrifugiert und der Überstand zur Sterilisation mit 0,1 ml Chloroform geschüttelt.

Der Hemmstoffnachweis erfolgte auf Rasen von Indikatorbakterien. Um gleichmäßige Rasen und gute Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde folgendes Verfahren gewählt: 0,1 ml einer TSB-Vorkultur von o.D. 0,05 wurden in 3 ml Softagar auf eine Grundschrift von 20 ml MHA gegossen.

Dafür sowie für das Gießen der Grundschrift wurden die Petrischalen waagerecht austariert, um eine einheitliche Schichtdicke zu erhalten. Auf den Softagar mit den Indikatorbakterien wurde von den Kulturüberständen je ein Tropfen mit einer Platinöse (Volumen etwa 10 µl) aufgetragen. Nach Antrocknen des Tropfens wurden die Platten vier Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Im Falle einer Hemmung am Ort des Tropfens wurden die folgenden Veränderungen des Rasens festgestellt:

+/- gerade erkennbar schwächeres Wachstum

- 1 deutlich geschwächtes Wachstum, Rasen aber noch geschlossen
- 2 Hemmung wie unter 1, aber im Randbereich nur noch einzelne Kolonien, oder aber stark geschwächtes Wachstum, bei dem Einzelkolonien erkennbar werden
- 3 nur noch vereinzelt Kolonien
- 4 kein Indikatorwachstum mehr.

War die Wachstumshemmung von Grad 1 oder stärker, so war auch im verdünnten Überstand noch Hemmaktivität

nachweisbar. Die Verdünnungsstufe, die einen +/- Effekt hervorrief, wurde als "Titer" definiert. Die Überstände wurden jeweils in Zehnerschritten soweit verdünnt, bis keine Hemmung mehr nachweisbar war.

Zum Nachweis induzierbarer Hemmstoffe wurden zusätzlich Produckerkulturen mit 0,1, 0,25 und 0,5 µg/ml Mitomycin C angesetzt und behandelt wie oben beschrieben.

Um sicherzustellen, daß eine Indikatorhemmung nicht auf Mitomycin C oder Chloroform zurückzuführen war, wurde auf den Rasen jeweils auch ein Tropfen unbewachsenes, chloroformiertes Medium mit Mitomycin C aufgetropft.

2.4. Phagenausschluß

2.4.1. Herstellung eines Phagenlysats

65 µl einer logarithmischen Produckerkultur von o.D. 0,375 in TSB wurden gleichmäßig auf einen Nährboden von 20 ml MHA mit 0,25 µg/ml Mitomycin C ausgespatelt (Einsaatdichte $3,8 \times 10^3$ Keime/mm³). Nach Bebrüten bei 32°C für 16 Stunden und anschließender Entfernung des Rasens wurden die Platten 15 min lang einer konzentrierten Chloroformatmosphäre ausgesetzt. Danach erfolgte die Überschichtung auf Indikatorrasen. Um die Abhängigkeit der Phagenproduktion von der Einsaatdichte festzustellen, wurden auf gleich vorbehandelte Platten jeweils 0,1 ml logarithmischer Indikatorvorkultur von o.D. 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 in 3,0 ml Softagar gegossen. Zum Vergleich mit ungehemmtem Wachstum wurden gleich dichte Indiaktorrassen auch auf unvorbehandelte MHA-Platten mit 0,25 µg/ml Mitomycin C gegossen.

Nach acht Stunden Bebrütung bei 37°C wurde der Lysegrad der Rasen beurteilt und die Softagarschicht mit

5 ml TSB von der Grundschrift abgeweicht. Die so erhaltene Suspension wurde zum Abtöten der Indikatorbakterien in Seitarmkolben gefüllt und mit 0,5 ml Chloroform 10 min lang bei 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Agarbrocken durch Zentrifugieren bei 10000 rpm (Sorvall, Rotor SS34), 4°C, 30 min lang abgetrennt.

0,1 ml vom Überstand wurden zusammen mit 0,1 ml Indikatorvorkultur (o.D. 1,0) in 3,0 ml Softagar auf Agarplatten (20 ml MHA) ausgegossen. Zum sicheren Erkennen der erwarteten Plaques wurde das Lysat zusätzlich in Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} verwendet. Nach Bebrüten über Nacht bei 37°C wurde der Rasen nach Phagenlöchern abgesucht, die Form der Plaques beurteilt und, womöglich, die Konzentration des Lysats an Phagen in PFU/ml bestimmt.

2.4.2. Modifizierter Phagennachweis im festen Medium

Wie unter II.2.1. beschrieben, wurden auf MHA-Platten mit 0,25 µg/ml Mitomycin C die Producer ausgespatelt, bebrütet, abgekratzt und die Platten chloroformiert. Anschließend wurde auf die Grundschrift ein Rasen von Indikatorbakterien (0,1 ml o.D. 1,0 in 3 ml Softagar) gegossen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Danach waren bei geringer Menge an Phagen einzelne Plaques in der zentralen Zone sichtbar, bei großen Mengen lagen sie außerhalb, bedingt durch Verschleppen an den Rand der Platte beim Abkratzen der Producerbakterien.

2.5. Bakteriozinanreicherung durch Sedimentieren

Kleine Volumina an Überständen mit geringer Hemmaktivität wurden in einem Ti50 Rotor 60 min lang bei 45000 rpm, 7°C zentrifugiert (Spinco L50). Größere Mengen an Überstand wurden in einem Ti60 Rotor 60 min lang bei 50000 rpm, 4°C zentrifugiert (Kontron TGA65).

Anschließend wurden aus den Röhren mit Pipetten und Peleusball neun Zehntel des Volumens abgezogen und verworfen. Im verbleibenden Volumen wurde das Pellet resuspendiert, so daß sedimentiertes Bakteriozin zehnfach angereichert war.

2.6. Antikörper gegen Rettgerocine

2.6.1. Antigenpräparation

Rettgerocin aus 1250 ml Überstand wurde im Ti60-Rotor auf 150 ml konzentriert. Die trübe Suspension wurde 30 min lang bei 5000 rpm, 4°C in einem SS34-Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Die Trübung erwies sich als sedimentierbar, wobei sich das Rettgerocin im Überstand wiederfand. 120 ml des geklärten Sediments wurden erneut im Ti60-Rotor sedimentiert, woraus 12 ml einer nunmehr hundertfach angereicherten Rettgerocinlösung resultierten.

9,6 ml dieser Lösung wurden auf 12 Saccharosegradienten überschichtet und 45 min lang bei 30000 rpm, 20°C zentrifugiert. Nach Austropfen der Gradienten wurden jeweils die mittleren zehn Fraktionen um die Fraktion mit der stärksten Hemmaktivität herum gepoolt. Durch Nachspülen der Röhrrchen mit Phosphatpuffer wurde das Volumen auf 38,5 ml gebracht. Zur Entfernung der Saccharose wurde anschließend gegen Phosphatpuffer (0,06 M) dialysiert. Es folgte ein erneutes Sedimentieren im Ti60 für zwei Stunden bei 50000 rpm. Der Überstand wurde bis auf 3,2 ml abgezogen.

Das Konzentrat wurde nun auf vier Saccharosegradienten verteilt und wie beim ersten Reinigungsschritt behandelt. Das gepoolte Volumen betrug 10 ml. Nach Dialysieren wurde im Ti50 zwei Stunden lang bei 45000 rpm, 4°C sedimentiert, so daß am Schluß 1 ml einer Reinprä-

paration vorlag, die zehnfach angereichert und durch Ultrazentrifugation, zweimalige Saccharosegradientenzentrifugation und Dialyse gereinigt worden war. Die drei hergestellten Präparationen wiesen im einzelnen folgende Werte auf:

Producerkultur	D3	D15b	J5
o.D.	1,1	1,5	1,0
Ausgangstiter (Überstand)	1:1000	1:1000	1:100
Titer der Reinpräparation	1:10000	1:10000	1:10000

2.6.2. Immunisierungstechnik und Serumgewinnung

Die Rettgerocinpräparation wurde mit komplettem Freund'schem Adjuvans Kaninchen subkutan in die Pfoten injiziert. Jeweils 0,2 ml Freund'sches Adjuvans wurden mit 0,2 ml Rettgerocinpräparat sorgfältig durchmischt und mit einer Intrakutankanüle auf den medialen und lateralen Zehenballen einer Kaninchenpfote verteilt. Drei Injektionen erfolgten in Abständen von sieben Tagen in drei Pfoten. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet und das Serum aufbereitet. Das Entbluten wurde in Barbituratnarkose (Evipan[®], langsam i.v. injiziert bis zum Erreichen des Toleranzstadiums) vorgenommen. Nach Präparieren einer Halsschlagader²³⁾ wurde diese distal abgeklemmt, und nach proximaler Durchtrennung das Blut in einem Glasrohr gesammelt. Das Blut wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C belassen. Nach Zentrifugation (Sorvall SS34, 10 min bei 3000 rpm) wurde das Serum dekantiert und durch Millipore-Filter (0,45 µm) bakterienfrei filtriert. Die so gewonnenen Sera wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.6.3. Präabsorption der Antisera und der Rettgerocinsuspensionen

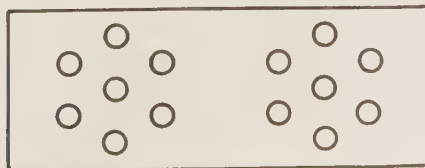
Zur Entfernung von Antikörpern gegen O-Antigen des Producerstamms wurden 10 ml einer O-Antigen-Präparation (s. II.2.7.1.) bei 8000 rpm (Sorvall SS34) 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml Antiserum gegen Rettgerocin desselben Stammes aufgenommen. Nach 60 min Stehenlassen bei Raumtemperatur - es hatte eine starke Ausflockung stattgefunden - wurden die Bakterien erneut 20 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand - das präabsorbierte Anti-Rettgerocinserum - dekantiert.

Die rettgerocinhaltigen Kulturüberstände wurden zur Entfernung von gelösten O-Antigen-Bestandteilen des Producers mit gleichen Mengen von Anti-O-Serums des jeweiligen Producers versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abzentrifugieren erwies sich als unnötig. Alle O-Antigen-Bestandteile in der Rettgerocinsuspension waren absorbiert (s. III. 2.3.1.).

2.6.4. Antikörpernachweis durch Immundiffusion

Glasobjektträger wurden mit 2 ml 0,6 %-iger Agaroselösung beschichtet und in die Schicht Löcher von 3 mm Durchmesser und einem Abstand von 5 mm (gemessen von Lochrand zu Lochrand) gestanzt, so daß um ein zentrales Loch ein Ring von sechs Löchern angeordnet war. Auf jedem Objektträger fanden zwei dieser Figuren Platz (Abb. 2).

Abb. 2: Immundiffusion nach Ouchterlony



Die Löcher wurden dann mit Glaskapillaren mit Antigen bzw. Antikörpern aufgefüllt. Die Anordnung wurde so gewählt, daß sich ein zu untersuchendes Antigen-Antikörper-Paar in benachbarten Löchern befand.

Nach 24 Stunden Diffusion bei Raumtemperatur wurden nichtpräzipitierte Proteinreste durch 48 Stunden Spülen in 0,9 % NaCl bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurde die Agarschicht bei 37°C eingetrocknet.

Die Präzipitate wurden mit Poncean BS (Standard Fluka) angefärbt.

2.6.5. Antikörpernachweis im Neutralisationstest

In Glasröhrchen wurden jeweils 0,2 ml Serumverdünnung und 0,2 ml Rettgerocinlösung gemischt und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Rettgerocinaktivität im Vergleich zu einer 1:2 verdünnten unbehandelten Lösung bestimmt.

2.7. Serotypisierung der Stämme

2.7.1 Antigenpräparation

Die Bakterien wurden aus einer TSB-Vorkultur eingeeimpft (o.D. 0,05) in Seitarmkolben mit 5 ml Peptonbouillon und bei 37°C, 150 rpm geschüttelt. Durch Zugabe von frischem Nährmedium wurde die o.D. zwischen 0,05 und 0,15 gehalten, bis ein Volumen von 80 ml erreicht war. Als in diesem Volumen die o.D. bei 0,80 lag, wurden die Bakterien abzentrifugiert (20 min, 4°C, 8000 rpm Sorvall SS34) und nach Abkippen des Nährmediums in 80 ml 0,9 % NaCl aufgenommen. Dieser Reinigungsschritt wurde zweimal wiederholt. Nach Resuspendieren der Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung (o.D. 1,0) wurden sie im Dampftopf (60 min bei 100°C) abgetötet.

2.7.2. Immunisierungstechnik

Kaninchen wurden durch i.v. Applikation (Ohrrandvene) eines O-Antigen-Präparats immunisiert. Die Injektionen erfolgten an jedem dritten Tag mit jeweils verdoppelten Dosen, beginnend mit 0,3 ml pro kg Körpergewicht. Sieben Tage nach der dritten Injektion wurden 2 ml Blut entnommen und der homologe Antikörpertiter im Röhrchenagglutinationstest (s. II. 2.7.3.) bestimmt. Lag der Titer bei 1:160 oder darüber, so wurden die Kaninchen entblutet, sonst erst drei Tage nach einer weiteren Antigen-Injektion (2,4 ml/kg). Entbluten und Serumaufbereitung erfolgten wie unter II. 2.6.2. beschrieben.

2.7.3. Röhrchenagglutinationstest mit O-Antigen

In Glasröhrchen von 10 mm Durchmesser wurden Serumverdünnungen in Zweierschritten von 1:5 bis 1:640 in gepufferter serologischer Kochsalzlösung (s. II. 1.2.8.) hergestellt (0,2 ml pro Rohr). Anschließend wurde in jedes Rohr 0,2 ml O-Antigen hinzugefügt, so daß sich insgesamt Serumverdünnungen von 1: 10 bis 1:1280 ergaben. Nach gründlichem Durchmischen und Inkubation bei 37°C über 16 Stunden wurde die höchste Serumverdünnung festgestellt, in der noch eine deutliche Agglutination stattgefunden hatte.

2.7.4. Objektträgeragglutination mit Lebendantigen

Als Antigen fanden Bakterienkolonien von frischen, über Nacht bebrüteten Peptonplatten Verwendung, die auf dem Objektträger in einem Tropfen 0,9 % NaCl ver-rührt wurden. Das Antigen wurde mit einem Tropfen Serum zusammengebracht, das so weit verdünnt war, daß homolog gerade noch eine kräftige Agglutination stattfand. Nach In- und Herschwenken des Objektträgers wurde geprüft, ob eine Agglutination stattgefunden hatte.

III. Ergebnisse

1. Producer im flüssigen Medium und ihr Indikatorspektrum

Die im festen Medium Rettgerocin produzierenden Stämme wurden auf Bakteriozinbildung im flüssigen Medium untersucht. Zwei Stämme bildeten zwar im festen Medium ein Bakteriozin, nicht aber im flüssigen (Tab. 1).

Tab. 1: Hemmstoffbildende Stämme und ihr Indikatorspektrum im festen und flüssigen Medium

Anzahl	Stämme	Indikatoren in festem Medium	Anzahl	Indikatoren in flüssigem Medium	Anzahl
14	D3,4,7,10,11ab,12,14,16,19,20,22,23,42	D15b,D18,D40a,D40b,H27b,J38,J42	7	D15a u.b.,D18,D37,D38,D40a u.b,H27b,J38,J42,J52,J55,J87	13
1	D 34	D40b, J38	2	D15b,D18,D40b,J27b,J38,J42,J87	7
1	D43	D18,D40a,D40b,E12,E18,H27a,J3,J38,J42,J50,J56,J87	12	D15b,D18,D34,D37,D38,D40ab,E12,E18H9,H27ab,J3,J5,J10,J38,J42,J50,J56,J67,J87,M11,M116,M199	24
1	E12	D3,D40a,D40b,H27b,J3,J5,J10,J38,J50,J52,J55,J56,J87,M11,M116,M199	17	D3,H27b,J3,J5,J9J10,J38,J50,J52,J55,J56,J87,M11,M116,M199	15
2	D15a,D15b	D34,E12,H9,H24,H27a,J3,J9,J10,J38,J56,J87,M11,M116	13	D3,D34,E7,E12,E18,H9,H24,H27a,H27b,J3,J9,J10,J38,J56,J67,J87,M11,M116,M199	19
4	D6,D21,D24,D32	J9	1	J9	1
1	D25	J9	1	J9,J52,J55,M116	4

Tab. 1 (Fortsetzung)

Anzahl	Stämme	Indikatoren in festem Medium	Anzahl	Indikatoren in flüssigem Medium	Anzahl
1	D28	J9, J87, M11	3	D15b, J3, J50, J52, J55, J87, M11, M116	8
1	D29	J87	1	J87	1
1	D41	J9, J56	2	E7, J9, H27a, H27b, J9, M56, M116	7
2	D86, D40b	D37, D38	2	D18, D37, D38, D40a, M11	5
1	D26b	M11, M116	2	D18, D37, D38, D40a, M11, M116	6
1	D2a	M116	1	M11, M116	2
1	D2b	M11, M116	2	M11, M116	2
2	D8a, D40a	-	-	M11, M116	2
1	D17	M11, M116	2	-	-
1	D26a	J10, M11, M116	3	M11, M116	2
3	D1, D30, D31	M11, M116	2	M11, M116	2
4	D27, D35, D37, D39	M11	1	M11, M116	2
1	D33	M116	1	M11, M116	2
2	H9, H24	J9, E7	2	E7, J3, J9	3
5	H11, H17, H21, H32, J33	E7	1	E7, J3, J9	3
1	H27a	J87			
1	H28	H27b			
1	H27b	D34, E18, H27a, J10, J38, J42, J50, J52, J55, J87, M199	11	-	-
1	E7	J9	1	H24, J9	2
1	E17	E7	1	E7, H9	2

Insgesamt wurden durch die im flüssigen Medium gebildeten Rettgerocine mehr Indikatoren gehemmt, d.h. 41 von 54 Producern erweiterten ihr Spektrum. Bei der Untersuchung im festen Medium ergeben sich 18 verschiedene Hemmuster (Tab. 2).

Tab. 2: Hemmspektren im festen Medium

Nr.	Hemmspektren	Producerstämme	Anzahl
1	D15b, D18, D40a, D40b, H27b, J38, J42	D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42	14
2	D40b, J38	D34	1
3	D18, D40a, D40b, E12, E18, H27a, J3, J38, J42, J50, J56, J87	D43	1
4	D3, D40a, D40b, H27b, J3, J5, J9, J10, J38, J50, J52, J55, J56, J87, M11, M116, M199	E12	1
5	D34, E12, H9, H24, H27a, J3, J9, J10, J38, J56, J87, M11, M116	D15a, D15b	2
6	J9	D6, D21, D24, D25, D32, E7	6
7	J9, J87, M11	D28	1
8	J87	D29, H27a	2
9	J9, J56	D41	1
10	D37, D38	D8b, D40b	2
11	J10, M11, M116	D26a	1
12	M116	D2a, D33	2
13	M11, M116	D1, D2b, D17, D26b, D30, D31	6
14	M11	D27, D35, D37, D39	4
15	J9, E7	H9, H24	2
16	E7	E17, H11, H17, H21, H32, H33	6
17	D34, E18, J10, J38, J42, J50, J52, J55, J87, H27a, M199	H27b	1
18	H27b	H28	1

Die im flüssigen Medium produzierten Hemmstoffe haben 17 verschiedene Indikatorspektren. Gegenüber den im festen Medium ermittelten Spektren zeichnen sich hier sowohl die drei großen Producergruppen (unter Nr. 1, 13, 14 in Tab. 3) als auch die einmalig vorkommenden Hemmsubstanzen (besonders von D25, D29, E7 und E17) deutlicher ab (Tab. 3).

Tab. 3: Hemmspektren im flüssigen Medium

Nr.	Hemmspektren	Producerstämme	Anzahl
1	D15a, D15b, D18, D37, D38, D40a, D40b, H27b, J38, J42, J52, J55, J87	D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42	14
2	D15b, D18, D40b, H27b, J38, J42, J87	D34	1
3	D15b, D18, D34, D37, D38, D40ab, E12, E18, H9, H27ab, J3, 5, 10, 38, 42, 50, 56, 67, 87, M11, M116, M199	D43	1
4	D3, H27b, J3, J5, J9, J10, J38, J50, J52, J55, J56, J87, M11, M116, M199	E12	1
5	D3, D34, E7, E12, E18, H9, H24, H27a, H27b, J3, J9, J10, J38, J56, J67, J87, M11, M116, M199	D15a, D15b	2
6	J9	D6, D21, D24, D32	4
7	J9, J52, J55, M116	D25	1
8	D15b, J3, J50, J52, J55, J87, M11, M116	D28	1
9	J87	D29	1
10	E7, H9, H27a, H27b, J9, J56, M116	D41	1
11	D18, D37, D38, D40a, M11	D8b, D40b	2
12	D18, D37, D38, D40a, M11, M116	D26b	1
13	M11, M116	D1, 2a, 2b, 8a, 26a, 27, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 40a	13
14	E7, J3, J0	H9, H11, H17, H21, H24, H32, H33	7
15	E7, E12, H9, H27b, J5, J87	H27a, H28	2
16	J9, H24	E7	1
17	E7, H9	E17	1

Damit kann man die untersuchten Producerstämme mit acht Indikatoren in 16 Gruppen unterteilen (Tab. 4).

Tab. 4: Schema zur Rettgerocintypisierung

Indikatorstämme								Rettgerocinlösung der Producerstämme (nach 8 h Inkubation bei 32°C; 150 rpm; 0,5 µg/ml Mitomycin C)
1 D15b	2 D38	3 D40b	4 E7	5 J9	6 J56	7 J87	8 M116	
+	+	+				+		D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20,22, 23,42
+		+				+		D34
+	+	+			+	+	+	D43
				+	+	+	+	E12
			+	+	+	+	+	D15a, D15b
				+				D6,D21,D24,D32,E7
				+			+	D25
						+	+	D28
						+		D29
			+	+	+		+	D41
	+							D8b, D40b
	+						+	D26b
							+	D1,2a,2b,8a,D26a,27,30,31,33,35,37, 39,40a
			+	+				H9,11,17,21,24,32,33
			+			+		H27a, H28
			+					E17

Neun Stämme können mit diesem Indikatorsatz als Erregertyp eindeutig identifiziert werden. Drei große Gruppen mit 14, 13 bzw. sieben Stämmen bilden Hemmsubstanzen mit gleichem Spektrum.

2. Charakterisierung der Rettgerocine

2.1. Zusammenhang zwischen Rettgerocinbildung und Kulturbedingungen

2.1.1. Der maximal erreichte Titer

Bei der Titration unter optimalen Bedingungen gewonnener Bakteriozine mit den empfindlichsten Indikatoren (s. Tab. 9) ergaben sich zwischen den Producern Titerunterschiede bis zum 1000-fachen (Tab. 5).

Tab. 5: Zusammenhang zwischen Hemmstofftiter und den Kulturbedingungen

P: Plaques im Hemmhof

k: Nur der unverdünnte Überstand zeigt eine Hemmwirkung

t: Für den maximalen Titer benötigte Bebrütungszeit

n: Maximal erreichter Titer, angegeben als $1:10^n$

Producer	Indikatoren (Beispiele)	n	t(h)	Mitomycin C µg/ml
D3,4,7,10,11a,11b,12,14 16,19,20,22,23,42,	D15b,D40b,H27b,J38 D40a	4 1	24	0,5
D34	D15b,D40b,H27b,J38 J42,J87	1 3	24 5-24	0,5 0,5
D43	D18,D40ab,H27ab,J3, J56,J87,E18 D34,H9,J5,J10,J38 J42,J50,J67,M199	3 1	24	0,5
E12, diffundierend	J3,J5,J9,J38,J50, J52,J55,J56	1	24	0,5
E12, nicht diffundierend	H27b,J9,J38,J87,M11 D3,J10,M116,M199	3 2	24	0,5
D15a,D15b	J9,H27a E18,J3,J67	3 k	24	0,5
D6	J9	3	24	0,5

Tab. 5 (Fortsetzung)

Producer	Indikatoren (Beispiele)	n	t(h)	Mitomycin C µg/ml
D21	J9	2	24	0,5
D24	J9	2	24	0,5
D32	J9	1	24	0,5
D25	J9	3	24	0,5
P	J52, J55	k		
	M116	2	5-24	0,5
D28	D15b, J87	2	24	0,5
P	J3, J50, J52, J55, M11	k		
	M116	2	5-24	0,5
D29	J87	2	24	0,1-0,5
D41	H27a	1	8	0,5
	H9, H27b, J9, J56	k		
D8b	D18, D40a, M11	1	8	0,25
P	D37, D38	3	5-24	0,1-0,5
D40b	D18, D40a, M11	1	8	0,25
P	D37, D38	3	8-24	0,1-0,5
D26b	D18, D38, D40a, M11, M116	1	8	0,5
D2a, D2b	M11	1-2	8	0,5
P	M116	2	8	0,5
D1	M11, M116	1	8	0,5
D8a	M11, M116	1	8	0,25
D26a	M11, M116	1	8-24	0,25
D27	M11, M116	1	8-24	0,25-0,5
D30	M11, M116	1	8-24	0,25-0,5
D31	M11, M116	1	8	0,25-0,5
D33	M11, M116	1	8	0,25-0,5
D35	M11, M116	1	8	0,25
D37	M11, M116	1	8-24	0,25-0,5
D39	M11, M116	1	8-24	0,25-0,5
D40a	M11, M116	1-2	8	0,25
J9	E7, J3, J9	2	8-24	0,5
H11	E7, J3, J9	1	8-24	0,5
H17	E7, J3, J9	1	8	0,25-0,5

Tab. 5 (Fortsetzung)

Producer		Indikatoren (Beispiele)	n	t(h)	Mitomycin C µg/ml
H21		E7, J3, J9	1-2	8-24	0,25-0,5
H24		E7, J3, J9	1-2	8	0,25-0,5
H32		E7, J3, J9	1-2	8	0,25-0,5
H33		E7, J3, J9	1	8	0,5
H27a		E7, E12, J9, H27b, J5	1	8	0,25
	P	J87	2	8	0,1-0,25
H28		E7, E12, H9, H27b, J5	1	8-24	0,25-0,5
	P	J87	2	8	0,25
E7		H24, J9	1	8	0,25-0,5
E17	P	E7, H9	1	24 8 oder	0,1 0,25-0,5

Producer mit identischem Indikatorspektrum produzierten meist annähernd gleiche Mengen Bakteriozin. Hohe Rettgerocintiter ($1:10^4$) erreichten D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42. Bis zu einer Verdünnung von 1 : 1000 ließ sich noch eine gleichmäßige Hemmwirkung nachweisen in den Überständen von D43, E12, D15a, D15b, D6 und D25. Die übrigen 34 Producer erreichten Titer zwischen 1:100 (J9, 11, 17, 21, 24, 32, 33) und 1:10 (D1, 8a, 26a, 27, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 40a).

Bei elf Producern fand sich gegenüber bestimmten Indikatoren keine gleichmäßig abnehmende Hemmwirkung mit zunehmender Verdünnung, sondern es zeigten sich in der höchsten Verdünnungsstufe entweder

- a) einzelne, deutliche Plaques bei ungehemmtem umgebenden Rasen innerhalb des Tropfens, oder
- b) eine fleckige Ausdünnung, die sich zum Teil schlecht von einem Hemmhof der Lysestärke 1 unterscheiden ließ, die zum Teil aber auch noch trübe, ineinander-

laufende Plaques erkennen ließ.

Zu a) Deutliche Plaques sah man bei D8b, D40b gegenüber D37, D38

E17 gegenüber E7, H9

H27a, H28 gegenüber J87.

Zu b) Oft nur eine fleckige Ausdünnung zeigten

D2a, D2b, D25, D28 gegenüber M116

D34 gegenüber J42, J87

D29 gegenüber J87.

Bei allen oben genannten Producern fanden wir in den anderen Verdünnungsstufen auch einzelne klare und/oder trübe Plaques aufgelagert auf einen gleichmäßig ausgedünnten Hemmhof und häufig einen unregelmäßigen, "ausgefressenen" Hemmhofrand. Aufgrund dieser andersartigen Hemmhofmorphologie gegenüber einigen Indikatoren schlossen wir bei D2a, D2b, D8b, D25, D28, D34, D40b und H27a, H28 auf zwei unterschiedliche Hemmsubstanzen.

Dasselbe gilt für E12; bei ihm zeigten sich auf den Indikatoren J3, J5, J9, J38, J50, J52, J55, J56 bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 auffallend große und unscharf begrenzte Hemmhöfe. In höheren Verdünnungen war entweder keine Hemmwirkung mehr nachweisbar (gegenüber J3, J5, J50, J52, J55, J56) oder es zeigte sich eine scharfe Begrenzung und normale Tropfengröße (gegenüber J9 und J38). Auch die übrigen Indikatoren (D3, H27b, J10, J87, M11, M116, M199) hatten in allen Verdünnungsstufen deutlich abgrenzbare und der Größe des aufgetragenen Tropfens entsprechende Hemmhöfe. Die beiden Hemmsubstanzen werden im folgenden als diffundierender und nicht diffundierender Hemmstoff von E12 bezeichnet. Es ließen sich durch Beobachtungen bei der Titration nach Producerstamm und Aussehen des Hemmhofs 64 Hemm-

stoffe unterscheiden.

2.1.2. Abhängigkeit des Titers von der Mitomycinkonzentration

Bei allen untersuchten Stämmen konnte durch Induktion mit Mitomycin C ein höherer Rettgerocintiter erzielt werden. 33 Producer (61 % - zum Vergleich: 39 % im festen Medium) zeigten auch ohne Induktion schon eine nachweisbare Rettgerocinproduktion, 12 mehr als im festen Medium (Tab. 6).

Tab. 6: Spontan Hemmstoff bildende Stämme im flüssigen Medium (unterstrichen sind diejenigen Producer, die auch im festen Medium spontan Hemmstoffe bilden - allerdings zum Teil gegen andere Indikatoren)

Producer	Indikatoren
<u>D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20,22,23,42</u>	D15b,D40b,H27b,J38,J42,J87
<u>D43</u>	D18,D40ab,E18,H27ab,J3,J56,J87
<u>E12</u>	H27b,J9,J38,J87,M11,M116,M199
<u>D15a,D15b</u>	E7,E12,H9,H27ab,J9,J10,J56,J67,J87,M11,M116,M199
D6,D24	J9
<u>D25</u>	J9,M116
D28	J87,M11
D29	J87
D8b,D40b	D37,D38
D26b,D30,D31,D33,D35	M11
H27a,H27	J87
<u>E17</u>	E7,H9

Bei sieben Producern waren die für die Hemmstoffbildung optimalen Bedingungen je nach Indikator verschieden. Dies waren ausnahmslos Stämme, bei denen wir schon aufgrund der Hemmhofmorphologie die Bildung von zwei Hemm-

substanzen angenommen hatten (D8b, D25, D28, D34, D40b, H27a, H28; s. Tab. 5).

Bei einer Mitomycinkonzentration von 0,1 µg/ml bildeten alle Producer nachweisbar Hemmstoffe, aber nur fünf von ihnen hatten dabei schon den höchsten Titer erreicht:

D8b, D40b gegenüber D37, D38

D29 gegenüber J87

H27a gegenüber J87

El7 gegenüber E7, H9 - das sind 8 % der unterschiedenen Hemmstoffe.

Die Bildung von 20 der 64 Hemmstoffe wurde durch 0,25 µg/ml Mitomycin maximal induziert. Bei 39 konnte durch Induktion mit 0,5 µg/ml ein höherer Titer erzielt werden als mit 0,25 µg/ml.

2.1.3. Abhängigkeit des Titers von der Bakteriendichte

Bei gleichen Wachstumsbedingungen (0,5 µg/ml Mitomycin, 24 h bei 32°C) aber im 7-fachen Volumen des Mediums erreichen 10 von 13 Producern eine niedrigere Bakteriendichte (o.D.), verbunden mit einem niedrigeren Hemmstofftiter; D28 und D32 haben trotz geringerer o.D. und El2 auch bei erhöhter o.D. den gleichen Titer wie im kleinen Volumen (Tab. 7).

Tab. 7: Der maximal erreichte Titer in Abhängigkeit von der Bakteriendichte bei verschiedenen großen Kulturvolumina

Producer- stamm	7 ml		50 ml	
	Titer	o.D.	Titer	o.D.
D3	10 ⁴	2,8	10 ³	1,8
D4	10 ⁴	2,7	10 ³	2,1
D23	10 ⁴	3,1	10 ³	1,9
D34	10 ³	5,0	10 ²	3,5

Tab. 7 (Fortsetzung)

Producer- stamm	7 ml		50 ml	
	Titer	o.D.	Titer	o.D.
D43	10^3	3,5	10^2	2,8
E12	10^3	3,0	10^3	45,
D15a	10^3	2,5	10^2	2,0
D15b	10^3	2,5	10^2	1,6
D6	10^3	1,1	10^2	0,6
D24	10^2	3,0	10	1,0
D32	10	5,0	10	1,2
D25	10^3	3,0	10^2	1,9
D28	10^2	3,5	10^2	2,6

Durch Verlängerung der Schüttelzeit der Kulturen im größeren Volumen produzierten die untersuchten 16 Producer bei sonst gleichen Bedingungen die gleichen Hemmstoffmengen wie im kleinen Volumen, wobei 11 von ihnen sogar eine etwas höhere o.D. im größeren Volumen erreichten (Tab. 8).

Tab. 8: Gleicher Titer bei verschiedenen Kulturvolumina durch Verlängerung der Schüttelzeit

Producer- stamm	7 ml, 8 h	20 ml, 13 h	Producer- stamm	7 ml, 8 h	20 ml, 13 h
	o.D.	o.D.		o.D.	o.D.
D1	5,0	6,0	H9	3,9	4,1
D26a	4,1	4,3	H11	0,7	1,3
D27	4,0	4,2	H17	1,3	2,0
D30	3,0	3,4	H21	2,0	2,0
D31	4,0	4,6	H24	2,0	2,5
D33	4,6	5,1	H32	1,5	0,8
D35	4,6	4,0	H33	3,6	3,9
D37	4,0	3,7			
D39	4,2	4,0			

Nach fünf Stunden Schüttelzeit hatten die meisten Producer noch keine nennenswerten Hemmstoffmengen gebildet. Ausnahmen sind vier Denver-Stämme, die mit 0,5 µg/ml Mitomycin schon nach fünf Stunden den maximalen Hemmstofftiter erreichten. Es handelt sich ausschließlich um Substanzen, die in ihren Hemmhöfen Plaques hervorriefen, und zwar

D8b gegenüber D37, D38

D25 gegenüber M116

D28 gegenüber M116

D34 gegenüber J42, J87.

Nach optimaler Schüttelzeit und Mitomycinkonzentration für die Bildung ihrer Hemmstoffe kann man die Producer in folgende Gruppen einteilen:

- a) 24 h; 0,5 µg/ml Mitomycin: D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20, 22,23,42, D34 (keine Plaques bildend), D43, E12 (beide), D15a u. b, D6, D21, D32, D25 und D28 (beide keine Plaques bildend)
- b) 8 h; 0,25 und/oder 0,5 µg/ml: D34, D25 u. D28 (alle drei Plaques bildend), D29, D41, D8b (beide), D40b (beide), D2bb, D2a u. b (beide), D1,8a,31,33,35 u. 40a, H17,24,32,33; H27a (beide), H28 (keine Plaques bildend), E7 u. E17
- c) 8 h; 0,5 µg/ml oder 24 h; 0,25 µg/ml: D26a, D27, D30, D37, D39; H9, H11, H21; H28 (keine Plaques bildend)

Für routinemäßige Untersuchungen von *Proteus rettgeri* auf Hemmstoffabgabe in flüssiges Medium ist eine Schüttelzeit von acht Stunden bei einer Mitomycinkonzentration

von 0,5 µg/ml am besten geeignet.

2.1.4. Abhängigkeit des Titors vom Indikatorstamm

Je nach Empfindlichkeit des Indikators schwankte der Bakteriozintiter eines Überstandes um das 10- bis 1000-fache (s. Tab. 5). Z. B. ließ sich für die Rettgerocine von D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42 für jede Verdünnungsstufe ein gerade noch empfindlicher Indikator finden:

Für $1:10^4$	J38
$1:10^3$	J87
$1:10^2$	D18
$1:10$	D40a

In Tab. 9 sind die Indikatoren nach der relativen Empfindlichkeit gegenüber dem Hemmstoff geordnet.

Tab. 9: Hemmspektren der unverdünnten Überstände nach relativer Indikatorempfindlichkeit

Producerstämme	Indikatoren mit größter ~	mit mittlerer ~	mit geringster Empfindlichkeit
D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42	D15b, D40b, H27b, J38, J42	D15a, D18, J52, J87	D37, D38, D40a, J55
D34	D15b, D40b, J42	D18, H27b, J38, J87	
D43	D18, D38, D40a, D40b, E18, H27a, H27b, J3, J56, J87	D15b, D37, E12, J5, J42, J50, M116	D34, H9, J10, J38, J67, M11, M199
E12	H27b, J9, J38, J87, M11	D3, J10, M116, M199	J3, J5, J50, J52, J55, J56
D15a, D15b	D34, E12, H27a, J9, J56, J87, M11, M116	D3, E7, H9, H24, H27b, J10, M199	E18, J3, J38, J67
D6, D21, D24, D32	J9		
D25	J9	M116	J52, J55
D28	D15b, J87, M116	J3, J52, J55	J50, M11
D29	J87		
D41	H27a	H9, H27b, J9, J56	E7, M116
D8b, D40b	D37, D38	D18, D40a, M11	
D26b	D40a, M11, M116	D18, D37, D38	
D2a, D2b	M116	M11	
D1, 8a, 26a, 27, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 40a	M11, M116		
H9, H11, H17, H21, H24, H32, H33	E7, J9	J3	
H27a, H28	E7, F12, H9, J5, J87	H27b	
E7	H24, J9		
E17	E7	H9	

Aus der Lysestärke des unverdünnten Überstands (s. Tab. 10) sind Rückschlüsse auf den Bakteriozintiter möglich. Eine vollständige Lyse bewirkt nur ein Titer von mindestens 10^2 . Ausnahme ist das diffundierende E12-Rettgerocin gegenüber J56, welches nur einen Titer von 10 hat und trotzdem eine 4er Lyse bewirkt. Bei einer Lysestärke von 1 kann man höchstens mit einem Titer von 10 rechnen. Eine Ausnahme bilden die Hemmstoffe, welche Plaques hervorrufen, z. B. der von D34 gegenüber J87 (Lysegrad 1 im unverdünnten Überstand bei einem Titer von 10^3). Tab. 10 zeigt die Lysestärken der unverdünnten Überstände.

Tab. 10: Lysestärken der unverdünnten Rettgerocinsuspensionen

I n d i k a t o r e n																													
P r o d u c e r - S t ä m m e					D e n v e r - S t ä m m e				E s s e n				H o n g k o n g				J a p a n - S t ä m m e					M ü n c h e n							
3 15a 15b 18 34 37 38 40a 40b					7 12 18				9 24 27a 27b				3 5 9 10 38 42 50 52 55 56 67 87					11 116 199											
D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42					2-3				4				4					2-3 1					3-4 1-2						
D34					2 1				1-2				1 2																
D43					3 4				4 4				4 4					1 2					4 4						
E12					2-3				2				4 4					1 2					3-4 1						
D15a, D15b					2				3 4				4 4					2 2-3 2-3 4					4 4 4						
D6																													
D21, D24, D32																													
D25																							2-3						
D28					2								1					1 1					3 1						
D29									1				2 1-2					1					2						
D41																							1-2						
D40b					1				3 3 1														1 1						
D26b					1				3 2-3 1														1 1						
D2a, D2b					1				1 1 1-2														1 1						
D1, 8a, 26a, 27, 30, 31, 33, 35, 37, 39, 40a																							1 1						
H9, H21, H32																							1 1						
H11, H17, H24, H33																							1 1						
H27a																							1 1						
H28																							1 1						
E7																							1 1						
E17																							1 1						
J5 (zum Vergleich)					1-2																		4 4 3 4						

2.2. Phagenausschluß

2.2.1. Phagenlysate

Weder aus der Hemmung eines Indikatorstriches (Bakteriozinnachweise im festen Medium) noch aus dem Aussehen eines Hemmhofes auf einem Indikatorrasen (Bakteriozinnachweise im zellfreien Kulturüberstand) läßt sich mit Sicherheit ablesen, ob es sich um vermehrungsfähige Hemmsubstanzen (Phagen) oder um Bakteriozine (nicht vermehrungsfähig!) handelt. Die zuletzt genannte Methode liefert lediglich Anhaltspunkte (s. III.2.1.).

Deshalb wurden bei den elf Producern, bei denen schon bei der Titration Plaques innerhalb der Hemmhöfe sichtbar waren, Phagenlysate hergestellt; ebenso als Kontrolle bei zwei Producerstämmen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rettgerocin (möglichst hochtitrig) gegen dieselben Indikatoren bildeten.

In den Lysaten aller phagenverdächtigen Producer waren PFU nachweisbar gegen dieselben Indikatoren, die auch bei der Titration der Überstände schon eine fleckige Ausdünnung oder Plaques zeigten. Einzige Ausnahme war der Indikator M11, der zwar beim Auftropfen von D2a- und D2b-Überstand gleichmäßig gehemmt wurde, der aber zusammen mit D2a, D2b-Lysat als Rasen gegossen Plaques aufwies.

Die Kontrollrasen der Indikatoren ("Wirte") zeigten keine Plaques. Eine Verfälschung des Ergebnisses durch Lysogenie der Indikatoren war somit ausgeschlossen (Tab. 11),

Tab. 11: Phagennachweis in Lysaten

Plaquesgröße: sehr klein = <0,5 mm (Nadelspitze)
 (Durchmesser) klein = 0,5-1 mm (Stecknadelkopf)
 mittelgroß = 1-2 mm
 groß = >2 mm (Glasstecknadelkopf)

Producer (lysogenes Bakterium)	Angerei- chert im Wirt	Gegossen mit	Lysegrad oder PFU/ml	Plaquesmorphologie
D2a	M11 M116	M11 M16	$2,82 \times 10^2$ $1,43 \times 10^5$	groß; außen schwache, zentral vollst. Lyse
D2b	M11 M116	M11 M116	$1,93 \times 10^3$ $1,35 \times 10^5$	groß; außen schwache, zentral vollst. Lyse
D8b	D38	D38	$3,84 \times 10^5$	klein; klar
D40b	D37 D38	D37 D38	$1,0 \times 10^6$ $2,3 \times 10^6$	klein; klar klein; klar
D34	J42 J42 J87	J42 J87 J87	gleichmäßige $6,2 \times 10^6$ $1,57 \times 10^7$	Ausdünnung, ~ler Lyse mittelgroß; zentral schwache, ringförmig vollst. Lyse
	J87	J42	gleichmäßige	Ausdünnung, ~ler Lyse
D25	M116	M116	$1,2 \times 10^5$	groß; außen schwache, zentral vollst. Lyse
D28	M116	M116	$1,56 \times 10^5$	mittelgroß; klar
D29	J87	J87	$4,4 \times 10^6$	mittelgroß; zentral schwache, ringförmig vollständige Lyse
H27a	J87 E7 E7	J87 J87 E7	$7,76 \times 10^5$ $2,1 \times 10^3$ -	sehr klein; trüb sehr klein; trüb
H28	J87	J87	$3,52 \times 10^5$	sehr klein; trüb
E17	E7	E7	$1,4 \times 10^3$	klein; trüb
D3	J42, J38	J42, J38, J87	gleichmäßige, schwache Ausdünnung, ~ler Lyse	
D43	J42, J87	J42, J87	gleichmäßige, schwache Ausdünnung, ~ler Lyse	
J5	M11	M11	-	

Tab. 11 (Fortsetzung)

Nach vorausgehendem Producerwachstum waren die Indikatorrasen ("Wirte", Spalte 2) entweder völlig lysiert (D35, D25, D28, D29, H27a, H28, E17, D3, D43, J5) oder deutlich gehemmt (D2a, D2b, D8b, D40b).

Die Lysate von nicht nachweisbar lysogenen Producern enthielten Rettgerocin mit einem Titer von 1 : 1000. Der Indikatorrasen wuchs dadurch nur geringfügig und gleichmäßig schwächer, durch verdünntes Lysat wurde er nicht mehr gehemmt.

Die phagenhaltigen Lysate bewirkten konzentriert zum Teil ebenfalls eine gleichmäßige Ausdünnung des Indikatorrasens; erst in größeren Verdünnungen waren isolierte Plaques erkennbar.

Ob die gleichmäßige Lyse durch dicht gelagerte Plaques oder durch ein zusätzlich vorhandenes Rettgerocin gegen denselben Indikator hervorgerufen wurde, läßt sich mit dieser Methode nicht sicher abklären.

2.2.2. Phagenausschluß durch modifizierten Hemmstoffnachweis im festen Medium

2.2.2.1. Optimierung der Methode

Wie unter 2.2.1. wurde auch hier der Phage von D8b und sein Wirt, der Indikator D38, gewählt. Nach dem Chloroformieren (s. II. 2.4.2.) wurde D38 in verschiedenen Verfahren auf die Platte aufgebracht:

- a) Durch Ausspateln von 100 µl mit einer o.D. von 1,0 bzw. 0,05: das Wachstum war so ungleichmäßig, daß keine Plaques erkennbar waren.
- b) Durch Ausgießen von 100 µl, o.D. 0,05, in 3 ml Softagar: der Rasen wurde zu dünn, Plaques waren schlecht zu sehen.
- c) Durch Gießen von 100 µl, o.D. 1,0, in 3 ml Softagar:

im Producerkreis war eine 2-3er Lyse zu erkennen, außerhalb des Kreises sah man dichte, aber deutliche, kleine, klare Plaques.

- d) Wie unter c), aber nach vorhergehendem Ausspateln von 100 μ l NaCl: im Kreis war der Rasen vollständig lysiert, außerhalb deutlich gehemmt (2-3er Lyse), und nur ganz am Rand waren einzelne Plaques erkennbar, da durch das NaCl zuviele Phagen an die Oberfläche gewaschen und nach außen verschleppt wurden.

Da schon durch das Gießen des Softagars ausreichend Phagen verschleppt werden, wurde zur systematischen Untersuchung das Verfahren unter c) angewandt. Ganz abgesehen vom größeren Arbeitsaufwand war durch das Ausspateln von 100 μ l 0,9 % Kochsalzlösung in fünf weiteren Fällen (bei D25, D28, D29, D34 und D40b) die Hemmung des Indikatorrasens außerhalb des Producerkreises so stark, daß keine Plaques mehr erkennbar waren und die Verwechslung mit einem Rettgerocin nahelag.

2.2.2.2. Negative Ergebnisse, unspezifische Effekte

Sowohl das Gießen eines Nicht-Indikators auf eine Platte nach Wachstum eines Producers als auch das Gießen eines Indikators auf eine Platte nach Wachstum eines Nicht-Producers ergaben folgendes Bild: Zentral zeigte sich eine stärkere Abschwächung des Indikatorwachstums, die zum Rand des Producerkreises hin kontinuierlich abnahm. Außerhalb des Kreises war der Indikator nicht gehemmt. Auf mitomycinhaltigen Platten war zum Teil nach vorhergehendem Producerwachstum am Rand des Kreises ein stärkeres Wachstum des Indikators zu beobachten als auf den mitomycinhaltigen Kontrollplatten ohne vorheriges Producerwachstum. Als

Erklärung wurde die Bindung des Mitomycins an die vorher gewachsenen Producerzellen angenommen. Im Zentrum des Producerkreises wurde dieser Effekt allerdings durch die stärkere Erschöpfung der Nährstoffe wieder aufgehoben. Auch die zentrale Lyse bei den mitomycin-freien Platten konnte durch den Nährstoffmangel - bedingt durch das vorhergehende Producerwachstum - erklärt werden.

2.2.2.3. Abschwächung des Indikators durch ein Rettgerocin

Wegen der Dichte des Indikatorrasens (o.D. 1,0 - zum Vergleich: beim Rettgerocinnachweis im Kulturüberstand hat der Rasen eine o.D. von 0,05) waren bei geringer Bacteriozinproduktion nur unspezifische Effekte sichtbar. Das war der Fall bei allen mitomycinfreien Platten, weiterhin trotz Induktion mit 0,25 µg/ml Mitomycin:

- a) gegenüber allen Indikatoren bei D1, 8a, 26a, 26b, 27, 30, 31, 33, 34, 37, 39, 40a;
bei H9, 11, 17, 21, 24, 32, 33;
bei D21, 24, 32, 41 und
bei E7
- b) gegenüber den in Tab. 9 als wenig empfindlich bezeichneten Indikatoren der Rettgerocine von D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42;
von D42, E12, D15a, D15b
- c) gegenüber einem Teil der Indikatoren (in Klammern), und zwar bei D2 (M11), D2b (M11), D8a und D40b, (D18, D40a, M11), D34 (D15b, D18, D40b, H27b, J38), D25 (J52, J55), D28 (D15b, J3, J50, J52, J55, J87, M11), H27a und H28 (E7, E12, H9, H27b, J5).

Bei ausreichend hohem Rettgerocintiter ergab sich im

Producerkreis eine scharf begrenzte Ausdünnung des Indikatorrasens. Eine vollständige Lyse innerhalb des Kreises und Rettgerocinverschleppung fanden wir gegenüber den empfindlicheren (s. Tab. 9) Indikatoren der Rettgerocine von D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42, von D43, D25, D6, D15a und D15b. Bei den Indikatoren mit geringerer Empfindlichkeit (s. Tab. 9) war die Lyse weniger vollständig, hielt sich aber (wie oben beschrieben) genau an die Grenzen des vorhergehenden Producerwachstums.

2.2.2.4. Abschwächung des Indikators durch Phagen

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter 2.2.1. zeigten dieselben elf Producer gegenüber denselben Indikatoren Plaques. Lediglich M11 hatte nach D2a- und D2b-Wachstum keine Plaques. Insgesamt boten die Platten ein bunteres Bild als unter 2.2.1. Zum Teil fanden sich Plaques nur außerhalb des Producerkreises, zum Teil war der Rasen innerhalb des Kreises kräftig und gleichmäßig ausgedünnt, und meist waren die Plaques auf derselben Platte sowohl verschieden groß als auch verschieden trüb (Tab. 12).

Tab. 12: Phagen im modifizierten Hemmstoffnachweis
auf festem Medium

Plaquesdurchmesser: s. Tab. 11

Mi = Mitomycingehalt: + = mit 0,25 µg/ml,

Ø = ohne Mitomycin

Producer	Wirt	Mi	Menge und Morphologie der Plaques
D2a,D2b, D25	M116	Ø +	kleine trübe Plaques "polymorph": sehr kleine und kleine, klare und trübe, mittelgroße trübe und große trübe mit zentral vollständigem Lyseknopf
D28	M116	Ø +	mittelgroße, klare Plaques gleichmäßige Ausdünnung vom Lysegrad 3
D8a	D37, D38	Ø +	unspezifische Effekte sehr wenige kleine, klare Plaques
D40a	D37, D38	Ø +	vereinzelte kleine, klare und trübe Plaques dichte kleine, klare und trübe Plaques
D8b	D37 D38	Ø + Ø +	einzelne kleine, klare Plaques dichte kleine klare Plaques dichte kleine, trübe Plaques sehr dichte trübe, zusammenfließende Plaques und diesen aufgelagert sehr kleine klare
D40b	D37 D38	Ø,+ Ø +	sehr dichte kleine, klare Plaques dichte mittelgroße, klare und trübe Plaques 1-2er Lyse; nur an Indikatorrestinseln mittelgroße klare und trübe Plaques sichtbar
E17	E7 H9	Ø + Ø +	dichte, sehr kleine trübe Plaques weniger dichte (schlechtes Wachstum des mitomycinempfindlichen Producers!), sehr kleine, trübe Plaques dichte, mittelgroße, klare Plaques mittelgroße bis große trübe Plaques, meist folgendermaßen aufgebaut: zentrale 1er Lyse, dann konzentrische Ringe mit vollständiger, dann 1er und zuletzt +/- Lyse
D34	J42 J87	Ø,+ Ø,+	kleine, klare Plaques mittelgroße trübe Plaques
D29	J87	Ø +	dichte kleine bis mittelgroße trübe Plaques dichte mittelgroße, klare Plaques
H27a	J87	Ø +	dichte mittelgroße, trübe Plaques dichte kleine, klare Plaques
H28	J87	Ø +	unspezifische Effekte dichte, sehr kleine trübe Plaques

2.2.3. Phagen; Zusammenfassung

Aufgrund der Titration der Kulturüberstände bestand bei elf Producern der Verdacht auf PFU im Überstand. Dieser Verdacht ließ sich in allen Fällen erhärten; zusätzlich wurden auf festem Medium noch Plaques sichtbar in D37, D38-Rasen nach vorhergehendem Wachstum von D8a und D40a. Die Überstände von D8a und D40a allerdings hemmen D37 und D38 nicht. Bei zwei Producern (D29 und E17) waren gegen alle empfindlichen Indikatoren Phagen nachweisbar, d. h. ein Bacteriocin konnte nicht sicher bewiesen werden. Bei den restlichen neun Producern wurden gegen einen Teil der gehemmten Indikatoren keine Phagen gefunden; d. h., daß es sich bei der hemmenden Substanz um ein Rettgerocin handelt.

Nach Wirten lassen sich fünf Phagentypen unterscheiden. Berücksichtigt man zusätzlich noch die Morphologie, so sind es sechs verschiedene, da man noch D28 von D2a, D2b und D25 unterscheiden kann.

Tab. 13: Phagentypen

	Lysogenes Bakterium	Wirt
Phage Nr.1	D2a,D2b,D25	M116
2	D28	M116
3	D34	J42
4	D34,D29,H27a,H28	J87
5	D8b, D40b	D37, D38
6	E17	E7, H9

2.3. Antigenität der Rettgerocine

2.3.1. Antikörpernachweis durch Immundiffusion

Zur Titration ließen wir die in Zweierschritten verdünnten Sera gegen die in die Mitte eingefüllte Antigenprä-

paration diffundieren. Je eine Präzipitationslinie ergab sich bei D3-Antikörpern (AK) gegen D3-Rettgerocin bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 8, bei D15b-AK bzw. J5-AK gegen D15b bzw. J5-Rettgerocin bis 1 : 4. Kreuzreaktionen zwischen den drei Sera waren in der Immundiffusion nicht nachweisbar.

Wir ließen daraufhin die unbehandelten Kulturüberstände aller Producer gegen die D3-Rettgerocin-AK diffundieren. Es ergab sich eine ineinander übergehende Präzipitationslinie bei den Überständen von D3, 4, 7, 10, 11a, 11b, 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 42. Alle übrigen Reaktionen waren negativ.

Rettgerocininaktivierende Substanzen in Kulturüberständen sind bereits beschrieben worden⁵⁾. Wir untersuchten daher auch unsere Rettgerocin-Antigenpräparationen daraufhin. In allen drei Präparationen waren Inaktivatoren nachweisbar. Es stellte sich somit die Frage, ob die oben beschriebenen Präzipitationslinien auf einer Reaktion der Antikörper mit dem Rettgerocin oder mit dem Inaktivator beruhten.

Zur Differenzierung zwischen Antikörpern gegen Rettgerocin einerseits und Antikörper gegen Inaktivator andererseits ließen wir die Antigenpräparation von D3 und J5 gegen das homologe O-Antigen-Antiserum (kurz O-AK) diffundieren.

Es bildeten sich in beiden Fällen Präzipitationslinien aus sowohl gegen die O-AK als auch gegen die Rettgerocin-AK. Da diese Linien auch noch ineinander übergingen, schlossen wir auf identische AK im Anti-O- und Anti-Rettgerocin-Serum bzw. darauf, daß unsere Antigenpräparationen O-Antigen-Bestandteile enthielten. Diese Vermutung konnten wir durch die beiden folgenden Experimente bestätigen:

- a) Wir präabsorbierten die drei Anti-Rettgerocin-Sera mit dem "homologen" Producer-O-Antigen und ließen diese O-AK-freien Sera sowohl gegen die Antigenpräparationen (höherer Reinheitsgrad der Rettgerocine) als auch gegen die einfachen Kulturüberstände diffundieren. Es fand keine Präzipitation mehr statt.
- b) Auf der anderen Seite wurden die gereinigten Rettgerocine ebenso wie die unbehandelten Kulturüberstände von D3 und J5 mit dem jeweiligen Anti-O-Serum präabsorbiert. Diese O-Antigen-freien Präparationen ergaben mit den Rettgerocin-AK keine Präzipitation mehr.

Es waren also keine präzipitierenden Antikörper gegen die Rettgerocine von D3, J5 und D15b nachweisbar. Vielmehr beruhten die Präzipitate auf einer Reaktion von AK mit O-Antigen-Bestandteilen, die offensichtlich unter den Kulturbedingungen für Rettgerocinbildung (s. II. 2.3.) in das Kulturmedium abgegeben wurden.

O-Antigen-Bestandteile im Kulturüberstand konnten bei 18 Productern in der Immundiffusion nachgewiesen werden (Tab. 14).

Tab. 14: O-Antigen in Kulturüberständen

Überstand des Producers	Präzipitat mit den O-AK gegen
D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20,22,23,42	D3
D6	D6, D24
D24	D6, D24
E7	E7
J5	J5

Die Kreuzreaktion zwischen D6 und D24 konnte bei der Serotypisierung der Stämme bestätigt werden (s. III.3.1.).

2.3.2. Antikörpernachweis im Neutralisationstest

2.3.2.1. Optimierung der Methode

Die von Kaninchen gegen Rettgerocine gebildeten Antikörper ließen sich am einfachsten nachweisen durch die Aktivitätsabnahme (Neutralisation) des Rettgerocins nach Zugabe des Antiserums. Zur Standardisierung der Methode wurde zuerst die Serumverdünnung bestimmt, bei der homolog die Aktivität des 1:100-titrigen Rettgerocins noch vollständig neutralisiert wurde. Für die J5- und D15b-Rettgerocin-Antikörper (AK) ergab sich ein Titer von 1:100, für die D3-AK von 1: 1000. Es ergaben sich folgende einseitige Kreuzreaktionen zwischen den Sera (bezogen auf einen Bakteriozintiter von 1:100):

AK gegen das Rettgerocin von	Neutralisation des Rettgerocins von		
	D3	D15b	J5
D3	+		+
D15b	+	+	+
J5			+

+ = Neutralisation

D3-AK neutralisierten noch in einer Verdünnung von 1 : 100 das J5-Rettgerocin vollständig, griffen das D15b-Rettgerocin aber nicht an. D15b-AK neutralisierten bis zu einer Verdünnung von 1:100 D3-Rettgerocin und bis 1:50 das J5-Rettgerocin. J5-AK inaktivierten weder das D3- noch das D15b-Rettgerocin.

Mit niedrigeren Serumverdünnungen als 1 : 100 wurde nicht gearbeitet, da die unverdünnten Sera komplett kreuzreagierten. Außerdem wurden einige Rettgerocine auch durch unverdünntes Normalserum und durch "he-

terologes" Anti-O-Serum (D2a, D2b, D8a, D8b, D40a, D40b, D26b durch D1-O-AK und D3-O-AK) inaktiviert. Die Kontrollen mit $1:10^2$ verdünntem Normalserum waren allerdings alle negativ, d. h. die Rettgerocine wurden nicht mehr nachweisbar angegriffen.

Da die absolute Anzahl der Rettgerocinmoleküle nicht ermittelt werden konnte, wurden die Titer gegenüber den empfindlichsten Indikatoren (s. Tab. 5 und 9) als Maß für die Bakterionzinmenge angenommen.

Bei Producern, die nur vergleichsweise geringe Rettgerocinmengen ins Medium abgaben (Titer höchstens 10), wurden in einem Vorversuch erst die unbehandelten Überstände mit den Sera versetzt. Nahm dabei die Rettgerocinaktivität nicht ab, so war auch bei höher-titrigem Material nicht mit einer Neutralisation zu rechnen. War nach Serumzugabe keine Aktivität mehr nachweisbar, so wurde das Rettgerocin einerseits durch Sedimentieren auf einen Titer von 10^2 angereichert, andererseits der niedrigtitrige Überstand mit Serum in einer zehnfach größeren Verdünnung versetzt.

Verschwand das Rettgerocin vollständig (Serumverdünnung 10^2 , Rettgerocintiter 10^2), so wurde die Aktivitätsabnahme mit 2+ bewertet (das Serum neutralisiert das Rettgerocin wie das homologe Rettgerocin); mit 1+ wurde eine deutliche Abschwächung bei vorhandener Restaktivität bezeichnet (Tab. 15).

Tab. 15: Rettgerocintypen im Neutralisationstest

2 : Aktivitätsabnahme wie homolog
1 : Aktivitätsabnahme weniger als homolog
P : Phage

Rettgerocin der Producer	Gegenüber den Indikatoren	Rettgerocinneutralisation bei Zugabe von AK gegen Rettgerocin von		
		D3	J5	D15b
D3,4,7,10,11a,11b,12,14, 16,19,20,22,23,41	alle, s.Tab. 3	2	-	2
D34	D18,D40a,H27b, D38,J38	-	1	-
		-	2	-
P	J42	-	2	-
P	J87	-	-	-
D43	alle, s.Tab.3	2	-	2
E12	H27b,J87	-	2	-
	J56	-	-	-
D15a,D15b	alle, s.Tab. 3	-	-	2
D6,D21,D24,D32	J9	1	-	2
D25	J9	1	-	2
P	M116	-	-	-
D28	J87	2	-	2
P	M116	-	-	-
D29 P	J87	1	-	2
D41	H27a,J56	-	2	-
D8b,D40b	D18,D40a	-	-	-
P	D37,D38	-	-	-
	M11	2	-	2
D26b	D18,D37,D38,D40a	-	-	-
	M11,M116	2	-	2
D2a,D2b	M11	1	1	1
P	M116	-	-	-
D8a,D40a	M11,M116	2	2	2
D1,D26a,D31,D33	M11,M116	2	-	2
D27,D30,D35,D37,D39	M11	1	-	2
	M116	2	-	2
H9,H11,H17,H21,H24,H32,H33	E7,J3,J9	-	-	-
H27a,H28	E7,H9,J5	-	-	-
P	J87	-	1	2
E7	J9,H24	-	-	-
E17 P	E7,H9	-	-	-
J5 (zum Vergleich)	H27b,J9,J38,M11	1	2	1
	M116	-	2	-

2.3.2.2. Ergebnisse der Neutralisation

Es ließen sich zehn Rettgerocinserotypen unterscheiden (Tab. 16).

Tab. 16: Rettgerocinserotypen

Aktivitätsabnahme wie homolog 2 ,
weniger als homolog 1

AK = Antikörper, Indikatoren in Klammern

Nr.	AK gegen			Rettgerocine der Producer-	Anzahl
	D3	J5	D15b	stämme	
1)	-	2	-	D5(M116),D34(H27b,D18,D40a), E12(H27b),D41	4
2)	-	1	-	D34(D38,J38,J42)	1
3)	-	-	2	D15a,D15b	2
4)	-	1	2	H27a(J87),H28(J87)	2
5)	1	-	2	D6,D21,D24,D32,D25(J9),D29; D27,30,35,37,39(M11)	11
6)	2	-	2	D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20, 22,23,42;D43,D28(J87), D8b u.40b(M11),D26b(M11,M116); D27,30,35,37,39(M116) D1,26a,31,33 (M11,M116)	28
7)	1	1	1	D2a,D2b(M11)	2
8)	1	2	1	J5(J9,J38,M11)	1
9)	2	2	2	D8a u.40a (M11,M116)	2
10)	-	-	-	D34(J87),E12(J56),D25 u.28(M116) D8b,40b,26b,(D18,37,38,40a) D2a u.2b(M116); H9,11,17,21,24, 32,33; H27a,28/J5),E7,E17	20

Zusätzlich zu den unter III.2.1. und 2. unterschiedenen 64 Hemmstoffen lassen sich mit diesem Verfahren also noch bei sechs weiteren Producern verschiedene Hemmstoffe charakterisieren: bei D26b gegen M11, M116 einerseits, D18,37,38,40a andererseits; bei D8b und 40b einen gegen M11, den anderen gegen D18,D40a.

Bei D34 kann man - zusätzlich zum Rettgerocin gegen D40b, H27b - unterscheiden zwischen dem Phagen gegen J42 und dem gegen J87.

Drei der elf nachgewiesenen Phagen werden durch Rettgerocin-AK inaktiviert (D34 gegen J42, H27a und H28 gegen J87), die restlichen acht allerdings nicht.

Insgesamt reagierten neun von 54 Überständen (17 %) mit keinem der Sera. Von den bis jetzt unterschiedenen 56 Bakteriozinen und 12 Phagen wurden neutralisiert:

Von den AK gegen	% der Hemmstoffe (Anteil an Rettgerocin R oder Phage P)
1) J5	6 % (3R, 1P)
2) D15b	3 % (2R)
3) J5, D15b	3 % (2P)
4) D3, D15b	50 % (33R, 1P)
5) D3, J5, D15b	6 % (4R)
6) keine Neutral.	32 % (14R, 8P)

2.4. Zusammenfassung: Charakterisierung der Hemmstoffe

Anhand der Hemmspektren und des Serotyps lassen sich acht Phagen (Tab. 17) und 19 Rettgerocine unterscheiden (Tab. 18).

Tab. 17: Phagentypen

Nr.	Serotyp	Lysogenes Bakterium	Wirt
1	-	D2a, D2b, D25	M116
2	-	D28	M116
3	-	D8b, D40b	D37, D38
4	D3, D15b	D29	J87
5	J5	D34	J42
6	-	D34	J87
7	J5, D15b	H27a, H28	J87
8	-	E17	E7, H9

Tab. 18: Rettgerocintypen

Rettgerocin Nr.	Serotyp	Producerstämme (Anzahl)	Hemmspektrum (Anzahl)
1	D3,D15b	D3,4,7,10,11a,11b,12,14,16,19,20,22,23,42 (14)	D15ab,18,37,38,40ab,H27b,J38,42,52,55,87 (13)
2	J5	D34	D15b,18,40b,H27b,J38 (5)
3	D3,D15b	D43	D15b,18,34,37,38,40ab,E12,18,H9,27ab,J3,5,10,38,42,50,56,67,87,M11,116,199 (24)
4	-	E12, diffundierend	J3,5,9,38,50,52,55,56 (8)
5	J5	E12, nicht diffundierend	D3,H27b,J9,10,38,87,M11,116,199 (9)
6	D15b	D15a,D15b (2)	D3,34,E7,12,18,H9,24,27ab,J3,9,10,38,56,67,87,M11,116,199 (19)
7	D3,D15b	D6,D21,D24,D32 (4)	J9 (1)
8	D3,D15b	D25	J9,52,55 (3)
9	D3,D15b	D28	D15b,J3,50,52,55,87,M11 (7)
10	J5	D41	E7,H9,27ab,J9,56,M116 (7)
11	-	D8b,D40b (2)	D18,D40a (2)
12	D3,D15b	D8b,D40b (2)	M11 (1)
13	-	D26b	D18,37,38,40a (4)
14	D3,J5,D15b	D2a,D2b	M11 (1)
15	D3,J5,D15b	D8a,D40a	M11,M116 (2)
16	D3,D15b	D1,26ab,27,30,31,33,35,37,39 (10)	M11,M116 (2)
17	-	H9,H11,H17,H21,H24,H32,H33 (7)	E7,J3,J9 (3)
18	-	H27a,H28 (2)	E7,12,H9,27b,J5 (5)
19	-	E7	H24,J9 (2)
RI	D3,J5,D15b	J5 (zum Vergleich)	D3,H27b,J9,10,38,52,55,87, M11,199 (11)
RII	J5	J5 (zum Vergleich)	M116

3. Serotypisierung der Proteus rettgeri-Stämme

3.1. Serotypisierung nach Gruber Widal

Sieben Anti-O-Sera wurden auf den homologen Antikörper(AK)-Titer und auf kreuzreagierende Antikörper (AK) untersucht (Tab. 19).

Tab. 19: Antikörpertiter und kreuzreagierende AK der Typisierungssera

AK gegen	O-Antigen						
	D1	D3	D6	D24	E7	J5	J9
D1	640						
D3		320					160
D6			160	160			160
D24			80	80			80
E7					80		320
J5						80	
J9							1280
Kontrolle NaCl							+

Wegen der kompletten Kreuzreaktion zwischen D6 und D24 entschieden wir uns für das höbertitrigste D6-Serum. Ebenfalls nicht verwendet wurde das J9-Serum, einerseits wegen der einseitigen Kreuzreaktionen, andererseits wegen der Selbstagglutination des J9-O-Antigens.

Typisiert wurden 54 Producer und sieben Indikatoren (D18, D38, E18, H27b, J5, J9, J67). In Tab. 20 ist angegeben, bis zu welcher Serumverdünnung die Antigene agglutiniert wurden.

Tab. 20: Ergebnisse der O-Serotypisierung nach Gruber
Widal

Antigen	Agglutination mit den O-AK gegen				
	D1	D3	D6	E7	J5
H9				80	
H11					
H17					
H21				80	
H24					
H27a		40	40	40	
H27b					
H28		160	80	20	
H32					
H33					
D1	640				
2a	1280	160	80		
2b	1280		20		
3		320			
4		320			
6			160		
7		320	10		
8a	320				
8b		40	40	10	
10		320			
11a		320			
11b		1280	40	20	
12		320			
14		1280	40	10	
15a					
15b		40	10		
16		320	10		
18	640				
19		640			
20		640			
21			320		
22		320			
23		640	20		
24			80		
25		320	1280		
26a	320			40	80
26b	1280	1280	1280	1280	1280
27	160				
28	20	320	20	320	160
29			10		
30	160				
31	320				
32			640		
33	320				
34					
35	320				
37	160				

Tab. 20 (Fortsetzung)

Antigen	Agglutination mit den O-AK gegen				
	D1	D3	D6	E7	J5
38	160				
39	160				
40a	320				
40b		40	20	10	
41			40		
42		320			
43			10		
J5					80
J9		160	160	320	
J67		20			
E7				80	
E12				10	
E17			10	160	
E18		160	160	10	

Von den 61 Stämmen waren neun (14,7 %) nicht typisierbar (D15a, D26b, D34, H27b, H11, H17, H24, H32, H33); dabei war nur einer von ihnen (D26b) selbstagglutinierend. Von 83 positiven Reaktionen entfielen 16 auf das D1-Serum, 25 auf das D3-, 24 auf das D6-, 15 auf das E7- und drei auf das J5-Serum.

Nach qualitativen Gesichtspunkten (Agglutination positiv oder negativ) lassen sich folgende 13 Serotypen unterscheiden:

Tab. 21: O-Serotypen der Producer- und Indikator-Stämme
+ = Agglutination bei einer Serumverdünnung von mindestens 1:10

Nr.	Serum gegen						Anzahl	Stämme
	D1	D3	D6	E7	J5			
1	+						10	D8a, 40a, D1, 27, 30, 31, 33, 35, 37, 39, D18, D38
2		+					9	D3, 4, 10, 11a, 12, 19, 20, 22, 42, J67
3			+				7	D43, D6, 21, 24, 32, D29, D41
4				+			4	E7, E12, H9, H21
5					+		1	J5
6	+		+				1	D26
7		+	+				5	D7, 16, 23, D15b, D25
8			+	+			1	E17
9	+	+	+				1	D2a
10		+	+	+			6	D11b, 14, D8b, 40b, H27a, H28, E18, J9
11	+			+	+		1	D26a
12	+	+	+	+	+		1	D28
13							8	D34, D15a, D26b, H11, 17, 24, 32, 33, H27f

Eindeutig zu unterscheiden sind damit sechs Stämme (D2a, D2b, D26a, D28, E17, J5).

Berücksichtigt man auch quantitative Unterschiede bei den Agglutinationsreaktionen, so lassen sich die Stämme weiter differenzieren (Tab. 22).

Tab. 22: O-Serotyp nach quantitativen Gesichtspunkten

Nr.	+ mit den Seren	Stärke der Agglutination	Stämme
1	D1	wie homolog	D1, D8a, D18, D31, D33, D35, D40a
2	D1	schwächer als homolog	D27, D30, D37, D38, D39
3	D3	wie homolog	D3, 4, 10, 11a, 12, 19, 22, 42
4	D3	schwach positiv	J67
5	D6	stärker als homolog	D32
6	D6	wie homolog	D6, D21, D24
7	D6	schwach positiv	D29, D41, D43
8	E7	wie homolog	E7, H9, H21
9	E7	schwach positiv	E12

Tab. 22 (Fortsetzung)

Nr.	+ mit den Seren	Stärke der Agglutination	Stämme
10	J5	nur homolog	J5
11	D1+D6	wie homolog + schwach positiv	D26
12	D3+D6	wie homolog + stärker als homolog	D25
13	D3+D6	wie homolog + schwach positiv	D7, D16, D23
14	D3+D6	schwach positiv	D15b
15	D6+E7	schwach positiv + wie homolog	D17
16	D1+D3+D6	wie homolog	D2a
17	D1+E7+J5	wie homolog	D26a
18	D3+D6+E7	wie homolog + stärker als homolog	J9
19	D3+D6+E7	wie homolog + schwach positiv	E18, H28
20	D3+D6+E7	wie homolog + schwach positiv	D11b, D14
21	D3+D6+E7	schwach positiv + wie homolog	H27a
22	D3+D6+E7	schwach positiv	D8b, D40b
23	D1+D6 +D3+J5 +E7	schwach positiv + wie homolog + stärker als homolog	D28

Durch Serotypisierung zu identifizieren waren insgesamt 13 Stämme (25 %), weitere 18 Stämme (30 %) waren nur von einem oder zwei weiteren Stämmen nicht zu differenzieren. Die restlichen 21 Stämme bildeten drei große Gruppen: sieben reagierten mit dem D1-Serum wie homolog und fünf schwächer als homolog; die übrigen neun reagierten mit D3-Serum wie homolog.

3.2. Typisierung mit Objektträgeragglutination

Es wurde versucht, 22 Stämme mit Hilfe der Objektträgeragglutination mit den Sera gegen D3 und D24 weiter zu differenzieren. Es ergaben sich positive (+) Reaktionen mit den Sera gegen D3 D24 bei den Stämmen:

+	-	D3,D11b,D25
-	+	D40a, D40b
+	+	D4,7,12,14,16,42,D24,D43
-	-	D8a,D8b,D10,11a,19,20,22,23,D2

Es lassen sich danach noch zusätzlich sechs Stämme identifizieren: D3, 11b, 14, 23, D8b und D40b.

Insgesamt konnten 19 Stämme (31 %) eindeutig charakterisiert werden.

4. Vergleich zwischen Serotyp der Producer und Rettgerocintyp

Zehn Rettgerocine (R1,6,7,11,12,14,15,16,17,18) werden von mehr als einem Stamm gebildet. Zwischen allen Producern desselben Rettgerocins zeigt sich serotypische Verwandtschaft (Tab. 23).

Tab. 23: Rettgerocine und der Serotyp ihrer Producer

Rettgerocin R,Nr.	Producer des Rettgerocins	Serotyp des Producers (s. Tab. 20) Serum, Stärke der Agglutination
R1	D3,4,10,11a,12, 19,20,22,42 D7,D16,D23 D11b,D14	D3 wie h D3 wie h, D6 schwach + D3 wie h, D6 u. E7 schwach +
R6	D15a D15b	- D3 u. D6 schwach +
R7	D6,D21,D24 D32	D6 wie h D6 stärker als h
R11, 12	D8b,D40b	D3 u. D6 u.E7 schwach +
R14	D2a D2b	D1 wie h, D6 schwach + D1 u. D3 u.D6 wie h

Tab. 23 (Fortsetzung)

Rettgerocin R,Nr.	Producer des Rettgerocins	Serotyp des Producers (s. Tab. 20) Serum, Stärke der Agglutination
R15	D8a, D40a	D1 wie h
R16	D1, D31, D33, D35 D27, D30, D37, D39 D26a	D1 wie h D1 schwächer als h D1 u. E7 u. J5 wie h
R17	H9, H21 H11, 17, 24, 32, 33	Ez wie h -
R18	H27a, H28	D3 u. D6 u. E7
R2	D34	-
R3	D43	D6 schwach +
R4,5	E12	E7 schwach +
R8	D25	D3 wie h, D6 stärker als h
R9	D28	D1 u. D3 u. D6 u. E7 u. J5
R10	D41	D6 schwach +
R13	D26b	-
R19	E7	E7 wie h
R20	J5	J5 wie h

h = homolog

+ = positiv

- = nicht typisierbar

So sind bei den vierzehn R1-produzierenden Stämmen neun serotypisch (auch quantitativ) identisch, die übrigen deutlich verwandt. Dasselbe gilt für die R16-Producergruppe (neun Stämme), aus der nur D26a herausfällt.

Die Producer der restlichen 10 Rettgerocine (R2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13, 19, 20) waren bereits durch den Rettgerocintyp eindeutig erkennbar, denn die genannten Rettgerocine werden von jeweils nur einem Stamm gebildet. Alle diese Producerstämme ließen sich - bis auf D41 und D43 (beide reagierten mit dem D6-Serum schwach positiv) - auch durch den Serotyp eindeutig unterscheiden.

5. Indikatoreigenschaften bei *Proteus rettgeri*

5.1. Empfindlichkeitsspektren

Von den 32 Indikatoren haben 11 identische Spektren: D34-E18-J67; D37-D38; H27a-H28; J10-M199; J52-J55.

Die übrigen 21 (65,6 %) sind durch ihr Empfindlichkeitsspektrum eindeutig charakterisiert (s. Tab.24).

Damit kann man bei den 32 bis jetzt bekannten Indikatoren aufgrund der Hemmung durch die charakterisierten 19 Rettgerocine und acht Phagen 26 Gruppen unterscheiden. Die Indikatoren werden von durchschnittlich vier von 27 Substanzen gehemmt (zwischen eins und neun). Zum Vergleich: die Rettgerocine hemmen je zwischen eins und 24 Indikatoren (durchschnittlich sechs von 32, s. Tab. 18). Erstellt man ein Typisierungsschema aufgrund der Indikatoreigenschaften analog zur Typisierung nach Hemmspektren aufgrund der Produzereigenschaften (s. Tab. 4), so lassen sich mit acht Rettgerocinen die 32 Indikatoren in 22 Gruppen einteilen - bestehend aus maximal vier Stämmen (Tab. 24).

Tab. 24: Schema zur Typisierung nach Rettgerocin-empfindlichkeit

Rettgerocine (s. Tab. 18)

1 R1	2 R2	3 R5	4 R6	5 R9	6 R10	7 R11	8 R18	Indikatorstämme
		+	+					D3
+								D15a
+	+			+				D15b
+	+					+		D18, D40a
	+		+					D34, E18, J67
+	+							D37, D38, D40b, J42
			+		+		+	E7
	+		+				+	E12
	+		+		+		+	H9
			+					H24
	+		+		+			H27a, H28, J56
+	+	+	+		+		+	H27b
	+		+	+				J3
	+						+	J5
		+	+		+			J9
	+	+	+					J10, M199
+	+	+	+					J38
	+			+				J50
+				+				J52, J55
+	+	+	+	+				J87
	+	+	+	+				M11
	+	+	+		+			M116

5.2. Indikatoren mit (teil)identischer Empfindlichkeit und ihr Serotyp

Folgende Stämme zeigten bei völlig oder weitgehend übereinstimmendem Empfindlichkeitsspektrum auch serotypische Verwandtschaft:

Indikatoren	Agglutination mit dem Serum
D18, D37, D38, D40a	D1
D15b/D40b	D3 u. D6/D3 u. D6 u. E7
E7, E12, H9	E7
E18/J67	D3 u. D6 u. E7/D3
H27a, H28	D3 u. D6 u. E7
M11, M116	Sero-, Lyso-, Biotyp gleich ¹⁾

Es fanden sich aber auch gegenteilige Beispiele. So waren trotz identischem Empfindlichkeitsspektrum serotypisch verschieden: J52 und J55, J10 und M199; J10, J38, J87 (ähnliche Spektren).

Auch der Schluß vom gleichen Serotyp auf gleiche Empfindlichkeit ließ sich nicht vollziehen; so haben D40b, E18 und J9 bei identischem Spektrum völlig verschiedene Empfindlichkeitsspektren (Tab. 25).

Tab. 25 (Fortsetzung)

Indi- kator	Serotyp	Rettgerocin Nr.										Phage Nr.																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8
J67	29:4																												
J87	22:1	+	+	+	+			+													+						+	+	+
	s. Dr. A. Bauern- feind 1)																												
M11	} bio-, sero- u. lyso- typisch gleich	+						+			+			+		+	+				+					+			
M16		+						+								+	+	+			+				+	+			
M199		+																				+							

5.3. Zuverlässigkeit der Indikatoren

Auf die Abhängigkeit des Rettgerocintiters vom Indikator wurde schon unter III.2.1.4. hingewiesen. Folgende Indikatoren zeichnen sich häufiger durch geringere Empfindlichkeit (relativ zu anderen Stämmen) aus: D15a, D37, D38, D40a; H9, H24; J3, J10, J50, J52, J55, J67; M11, M116. Sie werden durch die meisten Rettgerocine nur schwach lyseiert (Lysegrad 1). Wegen der relativ geringen Empfindlichkeit ist bei ihnen ein positives Ergebnis leichter zu beeinflussen, d. h. es ergeben sich größere Schwankungen in Abhängigkeit von dem Rettgerocintiter, der Tropfengröße, der Wachstumsphase des Indikators.

Die häufig fraglich positiven Indikatoren sind beim Rettgerocinnachweis a) im festen Medium: D35, D36, D37, D38, D39, D40a, E7, J9, J10, J38, J87, M199 - und b) im flüssigen Medium: D15a, D37, D38, D40a, E7, H9, H27a, J3, J50, J52, J67, J87, M11, M116.

Dabei sind folgende Indikatoren oft unempfindlich gegen Rettgerocine im festen Medium, während sie durch den Kulturüberstand desselben Producers gehemmt werden (in Klammern: Anzahl der Fälle).

D15a (14)	E7 (5)	J3 (8)	M11 (5)
D15b (17)		J52 (16)	M116 (8)
D18 (4)	H9 (5)	J55 (16)	M199 (3)
D37 (16)	H27b (6)	J87 (16)	
D38 (16)			
D40a (3)			

Wechselnde Indikatoreigenschaften zeigen M11 und M116. So war M11 zweimal negativ und fünfmal positiv gegenüber R3, einmal negativ und dreimal positiv gegenüber R9, und M116 viermal negativ, einmal positiv gegenüber R7, einmal negativ und zweimal positiv gegenüber R10, zweimal nega-

tiv und dreimal positiv gegenüber R15.

Wechselnde Indikatorempfindlichkeit findet sich gehäuft gegenüber den Rettgerocinen R6, R9, R10 und R16 und R17 (bei den beiden letztgenannten nicht zuletzt wegen des relativ niedrigen Titors).

Besonders häufig als Phagen erwiesen sich Hemmsubstanzen gegenüber den Indikatoren D37, D38, J42, J87 und M116.

5.4. Abhängigkeit der Empfindlichkeit vom Rettgerocintiter

Die Abhängigkeit der Indikatoreigenschaften vom Titer der aufgetropften Rettgerocinlösung zeigte sich am eindrucksvollsten am Rettgerocin von D34, R2. Nach Anreicherung der D34-Hemmsubstanz auf das Hundertfache erweiterte sich das Indikatorspektrum von D15b, D18, D40b, D27b, J38, J42, J87 um sechs Stämme (D15a, D37, D38, D40a, J52, J55) auf insgesamt 13. Damit zeigte der Überstand von D34 ein breites Hemmspektrum, das mit dem von R1 identisch war, obwohl die beiden Hemmstoffe klar unterschieden werden konnten (s.III. 2.2, 2.3. und 2.4.).

Nach zehnfacher Anreicherung von R16 wurde zusätzlich der Indikator J3 gehemmt.

Dasselbe gilt für R17 gegenüber H9 und H24 nach zehnfacher Anreicherung. Dabei ist bemerkenswert, daß sich H9 und H24 (beides Producer von R17) selbst hemmen.

IV. Diskussion

1. Herstellung von Rettgerocinpräparationen

Der erste Schritt zur serologischen Charakterisierung der Rettgerocine bestand in der Präparation gereinigter Hemmstoffe als Antigen. Daher wurden zunächst die Bedingungen untersucht, unter denen optimale Rettgerocinkonzentrationen in Flüssigkulturüberständen erreichbar waren. Die Induktion mit Mitomycin C erhöhte die Hemmstoffkonzentration je nach Producerstamm auf das Zehn- bis Hundertfache. Die höchsten Konzentrationen wurden bei 32°C und einer verbesserten O₂-Zufuhr durch Schütteln erreicht. Bis auf eine Ausnahme (Rettgerocin R4) waren alle hier untersuchten Rettgerocine so schwer (Molekulargewicht 2 bis 5 x 10⁷ D⁵), daß sie durch Ultrazentrifugation grob gereinigt und angereichert werden konnten.

Zur Immunisierung wurden drei Rettgerocine gewählt, die in ihrem Hemmspektrum deutlich voneinander verschieden waren. Alle drei riefen eine Immunantwort hervor. Die anfangs angewandte Immundiffusion war jedoch zum Antikörper-Nachweis nicht geeignet. Es zeigte sich, daß die Antigenpräparationen durch O-Antigenbestandteile verunreinigt waren. Das führte zu Präzipitationslinien, die nicht durch Rettgerocin-Anti-Rettgerocin-Immunkomplexe bedingt waren. Nach Präabsorption der Sera mit O-Antigen der Producer waren keine Präzipitate mehr nachweisbar. Möglicherweise war also die Agardiffusion nach Ouchterlony für diese Immunreaktion nicht sensitiv genug. Als sensitiver und spezifischer Test wurde daher der Neutralisationstest eingesetzt.

2. Serotypisierung der Rettgerocine

Alle drei Rettgerocine wurden durch die homologen Antisera neutralisiert. Außerdem traten folgende einseitige Kreuzreaktionen auf: R20 wurde von allen drei Sera neutralisiert, R1 noch zusätzlich von Anti-R6. Geht man von dem einfachsten Fall aus, daß bei den drei Rettgerocinen je eine Antigenkomponente Antikörper hervorgerufen hat, nämlich a bei R1, b bei R6 und c bei R20, so wäre bei R1 zusätzlich das Antigen b und bei R20 a und b vorhanden. Das bedeutet, daß R20 Determinanten aufweist, die zwar keine Antikörperbildung hervorriefen, deren Belegung mit kreuzreagierenden Antikörpern aber die bakterizide Aktivität blockiert. Bei dem hohen Molekulargewicht und dem komplexen strukturellen Aufbau der Rettgerocine ist es jedoch wahrscheinlich, daß die Antisera mehrere Antikörper gegen verschiedene Determinanten enthielten. Die einseitigen Kreuzreaktionen würden sich dann dadurch erklären, daß die Rettgerocine in einem Teil der antigenen Determinanten übereinstimmen.

15 der 21 Rettgerocine wurden durch mindestens eines der drei Antisera neutralisiert. Unter Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse (Neutralisation wie homolog bzw. schwächer) ließen sich neun "Serotypen" unterscheiden. Dabei trat der Serotyp R1/R6 besonders häufig auf, nämlich bei sieben Rettgerocinen. Der hohe Anteil an neutralisierten Rettgerocinen bei Verwendung von nur drei Antisera kann als Beweis ihrer engen Verwandtschaft gelten - dies um so mehr, als drei Rettgerocine mit allen Sera reagierten. An anderer Stelle⁵⁾ ist gezeigt worden, daß diese Rettgerocine auch im Molekulargewicht sehr ähnlich sind. Rettgerocine, die an den gleichen Rezeptor binden,

müssen auch ein gleiches Spektrum an Indikatorstämmen hemmen. Bei den hier untersuchten Rettgerocinen besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Hemmspektrum und dem Rettgerocin-Serotyp (s. Tab. 18). Folglich ist die Rezeptoraffinität eine von der Antigenstruktur unabhängige Determinante.

Nicht neutralisierbar war eine Gruppe von Rettgerocinen, die sich auch in anderen Eigenschaften wie Stabilität und erreichbarem Titer, von den übrigen Rettgerocinen unterschieden. Unter ihnen nimmt das nicht neutralisierbare Rettgerocin R4 auch von seinem niedrigen Molekulargewicht, seiner Diffusionsfähigkeit und seiner Trypsinempfindlichkeit⁵⁾ her eine unter den bisher bekannten Rettgerocinen einmalige Sonderstellung ein.

3. Serotypisierung der Bakteriophagen

Auch Bakteriophagen wurden durch die Anti-Rettgerocin-Sera neutralisiert. Hier zeigt sich die Verwandtschaft der Rettgerocine mit temperenten Phagen. Ähnliche Beziehungen wurden auch bei Pyocinen beschrieben²⁰⁾. Besonders auffällig ist sie bei dem von D34 gebildeten Rettgerocin R2 und dem Phagen (P5) gegen J42; beide zeigen den seltenen Serotyp R20. Diese Beziehung ist durch morphologische Untersuchungen der drei Rettgerocine, mit denen hier immunisiert wurde, bestätigt worden. Elektronenoptische Aufnahmen der Reinpräparationen zeigten Phagenschwanzstrukturen.⁴⁾ Die untersuchten Rettgerocine - jedenfalls soweit sie durch die Antisera neutralisierbar sind - stellen demnach wahrscheinlich Defektmutanten temperenter Phagen mit noch beakterizider Wirkung dar. Dafür spricht auch die Selbsthemmung, die bei H9 und H24 beobachtet wurde

(III.6.3). 1956 beschrieb Frederiq¹¹⁾, daß "unnatürlich" hoch konzentrierte Colicine ihren eigenen Producerstamm hemmten - trotz Immunität gegenüber natürlicherweise vorkommenden "normalen" Konzentrationen. Diese Colicine erwiesen sich als defekte Phagen.¹⁹⁾

4. Serotypisierung der Stämme

Ein weiterer Parameter zur Beschreibung der Verwandtschaft zwischen den untersuchten Producerstämmen mit gleichem Hemmuster bzw. zwischen den untersuchten Indiaktorstämmen mit gleichem Rezeptormuster wurde durch die Typisierung der Stämme nach O-Antigen erarbeitet.

Unser serologisches Typisierungsschema baut auf sechs Antisera gegen O-Antigene von Producer- und Indikatorstämmen auf. Nur zwei Sera zeigten eine komplette Kreuzreaktion, einseitige Kreuzreaktionen zwischen den Typstämmen kamen nicht vor.

Von 61 Stämmen waren mit diesem relativ kleinen Satz von fünf Antisera 52 typisierbar. Zahlreiche Stämme reagierten mit mehreren Sera, was die Differenzierungsmöglichkeiten verbesserte und außerdem auf einen komplexen O-Antigen-Aufbau bei *Proteus rettgeri* schließen läßt, wie er auch von Penner und Mitarbeitern¹⁷⁾ beschrieben wurde.

Mehrere Producerstämmen für ein *Rettgerocin* gehörten immer der gleichen Stammgruppe (Denver, Essen, Hongkong) an. Schon früher konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen Stämmen jedoch nicht um Kopien handelt.⁸⁾ So blieb abzuklären, ob nicht doch noch weitere Gemeinsamkeiten zwischen diesen Stämmen bestehen.

Tatsächlich erwiesen sich die Stämme, die das gleiche *Rettgerocin* bildeten, auch als serologisch verwandt.

Bergan konnte bei *Pseudomonas aeruginosa* entsprechende Zusammenhänge zwischen Pyocintyp und O-Serotyp feststellen.⁶⁾

In verschiedenen Arbeiten^{5, 18, 25)} wurde gezeigt, daß die Bakteriozin-Rezeptoren zur O-Antigen-Fraktion der Zellwand gehören. Bei uns zeigten Indikatorstämme, die von denselben Rettgerocinen gehemmt wurden, nur zum Teil serologische Kreuzreaktionen. Daraus folgt, daß für ein und dasselbe Rettgerocin - je nach Indikator - verschiedene Rezeptoren existieren.

Schrifttum

1. Bauernfeind, A.: Kreuzinfektion der Harnwege durch einen neuen Typ von *Proteus rettgeri*. Habilitationsschrift an der Ludwig Maximilians-Universität München (1973)
2. Bauernfeind, A.: Harnwegsinfektionen durch *Proteus rettgeri*, Fortschr. Med: 13, 588 (1973)
3. Bauernfeind, A., C. Petermüller und J. Burrows: Modifiziertes Verfahren zur Pyocintypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*, Zbl. Bact. hyg., I. Abt. Orig., A. 240, 271-278 (1978)
4. Bauernfeind, A.: Bakteriozinotypie bei *Providencia rettgeri*, Unveröffentlicht
5. Baumgarten, A.: Charakterisierung antibakterieller Aktivität in Kulturüberständen von *Proteus rettgeri*. Inauguraldissertation an der Ludwig Maximilians-Universität München (1981)
6. Bergan, T.: Epidemiological Markers for *Pseudomonas aeruginosa*, Acta path. microbiol. scand. Section B. 81, 70-80 (1973)
7. Brandis, H. und J. Smarda: Bakteriozine und bakteriozin-ähnliche Substanzen, Fischer Verlag Jena (1971)
8. Camissar, G.: Antimikrobielle Hemmstoffe bei *Proteus rettgeri*, Inauguraldissertation an der Ludwig Maximilians-Universität München (1977)
9. Craddock, M.E., W.H. Traub: Bacteriocinogeny in *Proteus rettgeri*. Experientia 27, 980 (1971)
10. Festl, R.: Lysotypie bei *Proteus rettgeri*. Inauguraldissertation an der Ludwig Maximilians-Universität München (1981)
11. Frederiq, P.: Resistance et immunité aux colicins. C.r. Soc. Biol. 150:1514 (1956)
12. Gillies, R.R. and J.R.W. Govan: Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production, J. Path. Bact. 91, 339-345 (1966)
13. Hellinger, B.: Ein neuer Weg zur Typisierung von *Proteus rettgeri*. Inauguraldissertation an der Ludwig Maximilians-Universität München (1976)
14. Homma, J.Y. and N. Suzuki: A simple protein with Pyocine activity isolated from the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa* and its close relationship to endotoxin. Jap. J. Exp. Med. 31: 209-213 (1961)

15. Ikeda, K., M. Kageyama and F. Egami: Studies of a pyocin. J. Biochem. Tokyo (1964)
16. Namioka, S. et R. Sakazaki: Etude sur les *Rettgerella*. Annales de l'Institut Pasteur. 94 no. 4 (1958)
17. Penner, J.L., N.A. Hinton and J. Hennessy: Serotyping of *Proteus rettgeri* on the basis of O-antigens. Canadian J. of Microbiol. Vol. 20, No. 5 (1974)
18. Reeves, P.: The Bacteriocins, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
19. Sandoval, N.K., H. Ch. Reilly and B. Tandler: C15: possibly a defective bacteriophage. Nature 205:522 (1965)
20. Shionoya, H., S. Yoto, M. Tsukamoto and J.Y. Homma: Relationship between pyocine and temperate phage of *Pseudomonas aeruginosa*. Jap. J. Exp. Med. 37 (1967)
21. Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker: Bacteriocins of gram-positive Bacteria. Bact. Reviews, Vol. 40, No. 3, 722-756 (1976)
22. Traub, W.H., F. Acker and J. Kleber: Studies on Phage Tail Bacteriocins of *Proteus rettgeri*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.229, 362-371 (1974)
23. Wegener, H.: Antibiose bei Enterobakterien und ihre Wechselwirkung mit Antibiotika. Inauguraldissertation an der Ludwig Maximilians-Universität München (1977)
24. Weir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology, Verlag Blackwell, Oxford and Edinburgh, 2. Aufl. (1973)
25. Weltzien, H.V., M.A. Jasaitis: The Nature of the Colicin K Receptor of *Escherichia coli* Cullen. J. Exp. Med. 133, 534-553 (1971)
26. Williams, C.A. and M.W. Chase: Methods in Immunology and Immunochemistry, Bd. 3, S. 238, Academic Press, New York, San Francisco, London (1971)

Lebenslauf

Am 08. August 1954 wurde ich als Tochter des Volksschullehrers Albert Götte und seiner Ehefrau Elisabeth in Bad Driburg geboren.

1973 bestand ich das Abitur am neusprachlichen Mädchen-gymnasium "Unserer Lieben Frau" in Büren, Westfalen.

Nach dem vorklinischen Medizinstudium in Würzburg von 1973 bis 1975 wechselte ich zur Universität München, bestand dort am 30. Oktober 1979 die Ärztliche Prüfung und erhielt am 11. November 1979 die Ärztliche Approbation.

Vom Januar 1980 bis Juni 1981 arbeitete ich als Assistenzärztin in der Klinik Dr. Wolfart in Gräfelfing (Chirurgie und Anästhesie), seitdem in der Angiologischen Abteilung des Zentralkrankenhauses Gauting (Innere Medizin).

